

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE DE MEDICINA VETERINARIA**

**UNIDAD DE POSGRADO**

**Impacto de los programas de vacunación contra  
*Mycoplasma hyopneumoniae* sobre el comportamiento  
serológico y productivo de porcinos en crianza  
intensiva en Lima – Perú**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Sanidad Animal

**AUTOR**

**Sonia Yenny CALLE ESPINOZA**

Lima – Perú

2008

## **DEDICATORIAS**

*A mis queridos padres Juanita y Arturo  
A ti Madre querida, amiga y confidente.  
Por todos los momentos que pasamos juntas  
Por enseñarme que en la vida no hay imposibles  
Y ahora por guiarme desde el cielo.*

*A mí querido Carlitos  
Esposo, grande y maravilloso  
Excelente profesional y hombre sencillo  
Gracias por todo tu apoyo y comprensión*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Al Dr. Néstor Falcón. Gracias  
Por toda su ayuda desinteresada*

*A los Drs: Felipe San Martín,  
Cesar Gavidia, Lenin Maturrana y Raúl Rosadio  
por enriquecer este trabajo*

*A Chris, Janet, Karen, Vanessa, Johana, Marlon, Francisco,  
Por ser parte de este trabajo*

*A todos mis compañeros de trabajo  
Gracias*

## TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS.....	iv
INDICE DE ABREVIATURAS.....	vii
RELACIÓN DE CUADROS.....	viii
RELACION DE ANEXOS.....	ix
RELACIÓN DE GRAFICOS.....	x
RELACIÓN DE FOTOS.....	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Antecedentes.....	3
2.2 Etiología.....	4
2.3 Epidemiología.....	8
2.3.1 Agente.....	8
2.3.2 Fuentes de transmisión.....	8
2.3.3 Hospedero.....	10
2.3.4 Factores ambientales.....	11
2.3.5 Enfermedad.....	12
2.3.6 Influencia en parámetros productivos.....	14
2.3.7 Complejo Respiratorio Porcino (CRP).....	15
2.4 Inmunidad.....	17
2.4.1 Inmunidad humoral.....	18
2.4.2 Inmunidad Celular.....	22

2.5	Fisiopatología.....	24
2.6	Signos Clínicos.....	31
2.7	Lesiones.....	33
2.8	Diagnostico.....	35
2.8.1	Aislamiento bacteriano.....	36
2.8.2	Pruebas de Laboratorio que detectan Antígenos.....	37
2.8.2.1	Anticuerpos Fluorescentes.....	37
2.8.2.2	Inmunohistoquímica.....	37
2.8.3	Pruebas Serológicas.....	38
2.8.3.1	Inhibición de la Hemaglutinación (HI).....	38
2.8.3.2	Inmunofluorescencia (IF).....	39
2.8.3.3	Inmunoperoxidasa (IP).....	39
2.8.3.4	Fijación de Complemento (FC).....	40
2.8.3.5	Inmuno Ensayo ligado a Enzimas (ELISA).....	40
2.8.3.6	ELISA indirecto.....	41
2.8.3.7	ELISA de bloqueo.....	42
2.8.4	Evaluación de Rastro.....	43
2.8.5	Pruebas de Laboratorio para la detección de ADN.....	44
2.8.5.1	Hibridación In Situ.....	44
2.8.5.2	Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	44
2.8.6	Diagnostico diferencial.....	46
2.9	Tratamiento.....	47
2.10	Control y prevención.....	47
2.10.1	Control por Erradicación.....	47
2.10.2	Control por medidas de Manejo y Bioseguridad.....	50
2.10.3	Vacunación.....	52
2.10.3.1	Vacunación de Marranas.....	54
2.10.3.2	Vacunación de lechones.....	56
III.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
3.1	Lugar de estudio.....	61
3.2	Animales y tamaño muestral .....	61
3.3	Sistema de manejo de los porcinos en la granja.....	62

3.4	Diseño Experimental.....	63
3.5	Biológicos utilizados.....	64
3.6	Materiales usados en el muestreo.....	64
3.7	Materiales y Equipos usados en el Laboratorio.....	64
3.8	Método de colección de la muestra.....	65
3.9	Método de detección de anticuerpos.....	65
3.9.1	Preparación de las muestras.....	66
3.9.2.-	Preparación de la solución de lavado.....	66
3.9.3.-	Procedimiento del análisis.....	66
3.9.4.-	Lectura e interpretación de los resultados. ....	67
3.10	Método de evaluación de consolidación pulmonar.....	68
3.11	Análisis Estadístico.....	72
IV.	RESULTADOS.....	73
V.	DISCUSIÓN.....	81
VI.	CONCLUSIONES.....	90
VII.	RECOMENDACIONES.....	91
VIII.	BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	92
IX.	ANEXOS.....	114
X.	FOTOS.....	118

## **ÍNDICE ABREVIATURAS**

1.	Complejo Mayor de Histocompatibilidad	MHC
2.	Complejo Respiratorio Porcino	CRP
3.	Densidad Óptica	DO
4.	Factor de Necrosis Tumoral	TNF
5.	Fijación de Complemento	FC
6.	Fosfolipasa C	PLC
7.	Ganancia Diaria de Peso	GDP
8.	Granulocitos y Monocitos	GM
9.	Heat Shock Proteins	HSP
10.	Inhibición de hemoaglutinación	HI
11.	Inmunoglobulina A	Ig A
12.	Inmuno Ensayo Ligado a Enzimas	ELISA
13.	Inmunofluorescencia	IF
14.	Interleucinas	IL
15.	Kilo Dalton	KD
16.	Linfocito B	LB
17.	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	Mh
18.	Monocitos P	MCP
19.	Neumonía Enzoótica	NE
20.	Neumonía Micoplasmal del Cerdo	NMC
21.	<i>Pasteurella multocida</i>	Pm
22.	Polimorfonucleares	PMN
23.	Proteína 97	P97
24.	Reacción de la cadena de Polimerasa	PCR
25.	Región uno	R1
26.	Respuesta Inmune Humoral	RIH
27.	Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino	PRRS
28.	Sistema Inmune	SI
29.	T Helper un	Th 1
30.	Virus Influenza Porcina	SIP

## **RELACIÓN DE CUADROS**

CUADRO No. 1.- Estudio en porcinos procedentes de madres sin antecedentes de vacunación contra <i>M. hyopneumoniae</i> .	63
CUADRO No. 2.- Estudio en porcinos procedentes de madres con antecedentes de vacunación contra <i>M. hyopneumoniae</i> ..	63
CUADRO No. 3.- Porcentaje de participación de cada lóbulo en relación del peso total del pulmón.....	69
CUADRO No. 4.- Puntuación según la extensión de la lesión de consolidación pulmonar en cada lóbulo.....	69
CUADRO No. 5.-Área de consolidación pulmonar por lóbulos.....	71
CUADRO No. 6.- Puntuación relativa a las categorías de volumen de consolidación pulmonar.....	71
CUADRO No. 7.- Calculo del Índice d neumonía de la granja de acuerdo al No de animales.....	72
CUADRO No. 8.- Interpretación de los valores obtenidos en el cálculo del índice para neumonía (IPP).....	72



Cuadro No. 9.- Distribución de pesos finales procedentes de madres sin antecedentes de vacunación contra <i>M. hyopneumoniae</i> ...	74
Cuadro No. 10.- Distribución de los grados de consolidación pulmonar En cerdos procedentes de madres sin antecedentes de vacunación contra <i>M. hyopneumoniae</i> .....	76
Cuadro No. 11.- Distribución de pesos finales de cerdos procedentes de madres con antecedentes de vacunación contra <i>M. hyopneumoniae</i> .....	78
Cuadro No. 12.- Distribución de los grados de consolidación pulmonar en porcinos procedentes de madres con antecedentes de vacunación contra <i>M. hyopneumoniae</i> .....	79

## **RELACIÓN DE GRÁFICOS**

Grafico No.1.- Diseño esquemático del pulmón del porcino en posición dorsal.....	70
Grafico No.2.- División imaginaria de los lóbulos pulmonares en cuatro partes iguales .....	70
Grafico No.3.- Distribución de títulos de anticuerpos contra <i>M. hyopneumoniae</i> en porcinos procedentes de madres sin Antecedentes vacunación.....	75
Grafico No.4.- Comparación entre peso final y grado de consolidación pulmonar entre porcinos procedentes de madres sin antecedentes de vacunación contra <i>M. hyopneumoniae</i>	77
Grafico No.5.- Distribución de títulos de anticuerpos contra <i>M. hyopneumoniae</i> en porcinos procedentes de madres con antecedentes de vacunación.....	78
Grafico No.6.-Comparación entre peso final y grado de consolidación pulmonar entre porcinos procedentes de madres con antecedentes de vacunación contra <i>M. hyopneumoniae</i>	80

## **RELACIÓN DE ANEXOS**

Anexo 1.- Distribución de los títulos de anticuerpos contra <i>M. hyopneumoniae</i> en cerdos procedentes de madres sin antecedentes de vacunación.....	114
Anexo 2.- Distribución de los títulos de anticuerpos contra <i>M. hyopneumoniae</i> en cerdos procedentes de madres con antecedentes de vacunación. ....	115
Anexo No. 3 Medición de Anticuerpos en diferentes tratamientos.	116
Anexo No. 4 Medición de Anticuerpos en diferentes tratamientos	116
Anexo No.5 MEDICIÓN DE INDICE DE PULMONES Grupo de porcinos provenientes de madres no vacunadas.....	116
Anexo No.6 MEDICIÓN DE INDICE DE PULMONES Grupo de porcinos provenientes de madres vacunadas.....	117
Anexo 7.- COMPARACIÓN DE INDICE DE PULMONES VS GANANCIA DE PESOS en Grupo de porcinos provenientes de madres con y sin Vacunación.....	117

## RELACIÓN DE FOTOS

Foto No 1.-	Lesiones macroscópicas de pulmones con Índice paraneumónico.....	118
Foto No 2.-	Bronconeumonías o pleuroneumonías graves irreversibles, localizadas en bordes de los lóbulos apicales y cardíaco del pulmón con tonalidad grisácea que pasa a rosa intenso y rojo oscuro.....	118

## **RESUMEN**

El presente trabajo evaluó dos programas de vacunación en animales contra Neumonía Enzoótica procedentes de madres con y sin antecedentes de vacunación contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. Se trabajaron 240 porcinos de crianza intensiva, divididos en dos grupos de 120 animales cada uno, con 4 tratamientos de 30 lechones: vacunados con dos dosis a los 35 y 56 días, 42 y 56 días; vacunados con una dosis a los 42 días, y el control (placebo). La medición de anticuerpos fue mediante la prueba de ELISA a las 3, 6, 10, 12, 16 y 21 semanas de edad. Los animales fueron pesados a los 21 y 145 días a fin de obtener la ganancia de peso. En el grupo 1 (madres sin vacunación), se encontró que no existía diferencia significativa entre la ganancia de peso de los animales según tratamiento. Los títulos de anticuerpos fueron similares entre los grupos de vacunación. El grado de consolidación pulmonar fue estadísticamente diferente entre los grupos, siendo mayor en el control ( $p=0.006$ ). En el grupo 2 (madres vacunadas), no hubieron diferencias significativas entre la ganancia de peso de los animales según tratamiento. Los títulos de anticuerpos y el grado de consolidación pulmonar fueron similares entre los grupos de vacunación.

**Palabras clave:** vacunación, *Mycoplasma hyopneumoniae*, anticuerpos, peso, IPP, ELISA, porcinos.

## **ABSTRACT**

This paper presents data of an evaluation of two vaccination programs for Enzootic Pneumonia in piglets born from vaccinated or unvaccinated sows against *Mycoplasma hyopneumoniae*. Two hundred and forty piglets maintained under intensive conditions were separated into two groups of 120 each. Each one of the groups was separated into 4 treatment subgroups of 30 piglets each that received vaccination on days 35 and 56, 42 and 56 days; vaccinated with a single dose on day 42 and a control group sham vaccinated with a placebo. Antibodies were measured by the ELISA technique on weeks 3, 6, 10, 12, 16 and 21 of life. The animals were weighted on days 21 and 145 to measure body weight gains. In group 1 (coming from unvaccinated sows) there were no significant differences in weight gains among the treatment subgroups. The antibody titers were similar among the vaccination subgroups. The level of lung consolidation was statistically significant among the vaccinated groups being highly significant in the control group ( $p=0.006$ ). In group 2 (born from vaccinated mothers), There were no significant differences in body weight gain among all the subgroups of different treatments. The antibody titers and the degree of lung consolidation were similar among the vaccinated groups.

**Key words:** vaccination, *Mycoplasma hyopneumoniae*, antibodies, weight, IPP, ELISA, pigs.

## **I. INTRODUCCIÓN**

La neumonía enzoótica (NE) o neumonía mycoplasmal es una de las más importantes enfermedades respiratorias porcinas que afecta a todas las edades, desde destetados hasta la finalización, causando grandes pérdidas económicas en la industria porcina a nivel mundial.

La NE usualmente causa problemas en los sistemas de producción intensivos o en sistemas de producción continuos, especialmente en las granjas que tienen problemas de ventilación y manejo deficiente (Ross, 1999 Quinn et al. 2002). El agente causal de la NE, es el *Mycoplasma hyopneumoniae*, el cual juega un papel significativo en la enfermedad del complejo respiratorio porcino CRP (Halbur, 1998), y es capaz de exacerbar las lesiones pulmonares generando pobre desarrollo (Roberts and Almond, 2003), Disminución de la ganancia diaria de peso y desmejora de la eficiencia de conversión alimenticia (Morrison *et al.*, 1984).

La neumonía por micoplasma en porcinos produce una alta morbilidad y baja mortalidad (Stipkovits, 1995). El gran impacto económico se debe a la disminución en la velocidad de crecimiento (Hill *et al.*, 1992) Copes *et al.*, 1995) y desuniformidad del lote (Camacho y Calle 2003).

Estudios realizados, indican que la inmunidad pasiva que reciben los lechones procedentes de madres no vacunadas, protejan a sus crías hasta la sexta u octava semana, descendiendo a medida que los animales pasan a las unidades de crecimiento y acabado (Armstrong, 1982), quedando en un

período de susceptibilidad. Ante estas circunstancias se han desarrollado vacunas que además de proteger al animal, redunden en una mayor ganancia de peso y una menor morbilidad.

A pesar que la introducción de vacunas comerciales en el mercado se ha dado desde hace algunos años, esta enfermedad sigue siendo un problema en la industria porcina (Chang, 2001), ya que muchos productores no vacunan y por otro lado, las vacunas disminuyen el grado de lesiones pero no impiden la colonización del micoplasma.

En la mayoría de granjas porcinas en nuestro país, comenzaron a vacunar utilizando dos dosis, aplicando diferentes esquemas de vacunación con inclusión o no de vacunación de madres gestantes y de lechones. En la actualidad hay en el mercado disponibilidad de vacunas monodosis con adyuvante oleoso, que tiene la ventaja de reducir el manejo y estrés del animal (Kuhn, 2003).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar dos programas de vacunación en porcinos contra Neumonía Enzoótica procedentes de madres con y sin antecedentes de vacunación contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.



## **II.- REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1.- ANTECEDENTES**

La neumonía por *Mycoplasma* ha sido reportada en varios países, siendo considerada una de las enfermedades más comunes y económicamente importante en la producción porcina (Ross, 1986). Durante más de cien años se ha conocido la enfermedad (Goodwin, 1982), sin embargo inicialmente se le consideraba como pasteurellosis crónica de los porcinos hasta que “Huytra” en 1970 excluyó el papel primario de la infección denominándola “Neumonía enzoótica del cerdo” (Stipkovits, 1995).

En los años de 1930, se iniciaron los estudios de agentes virales; así que, se pensó que podía ser un virus debido a que no era removido por filtros como lo eran las bacterias (Janke, 1997), atribuyéndose esta enfermedad a un virus de Influenza (Piffer, 1983) recibiendo la denominación de “Gripe de los Lechones”. Por 1933 se mencionó en estudios de Köbe. La caracterización de la neumonía crónica en porcinos, propuesta en trabajos de investigación de Pullar (1948), Gulrajani y Beveridge (1951).

En los años de 1950 s le dio diferentes denominaciones tales como: Neumonía Virógena Porcina (Betts, 1952), Tos Infecciosa del cerdo (Rislaakki, 1953), Neumonía Virógena Enzoótica (Hjärre *et al.*, 1952) y Neumonía Enzoótica del cerdo (Wesslén y Lannek, 1954).

En 1965 tanto Mare y Switzer, así como; Goodwin *et al.*, describieron por primera vez el aislamiento del *Mycoplasma* a partir de un pulmón neumónico, logrando reproducir en forma experimental la enfermedad; denominándola *M. hyopneumoniae* y *M. suis* respectivamente, dándose prioridad al primer nombre.

Actualmente se considera *Mycoplasma hyopneumoniae* como denominación correcta y está avalado desde 1974 por el subcomité de taxonomía de *Mycoplasma* (Trully y Whitcomb, 1979).

## 2.2.- ETIOLOGÍA

Los *Micoplasmas* son los organismos más pequeños capaces de replicarse en medios de cultivo exentos de células. Se distinguen fenotípicamente de las otras bacterias por su tamaño reducido y la ausencia total de pared bacteriana.

Taxonómicamente pertenecen a la Clase Mollicutes, Orden Mycoplasmatales y Familia Mycoplasmataceae. Recientemente los micoplasmas se han incluido en la sección XXI (*Mollicutes*) del volumen 3 (bacterias gram positivas con bajo contenido en G+C), de la 2ª edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Poveda *et al*, 2002).

Son organismos procariotas extracelulares que se reproducen por fisión binaria como otras bacterias (Janke, 1997). Los micoplasmas constituyen un grupo de microorganismos relacionados con bacterias gram positivas, pero que en el curso de la evolución y después de una serie de mutaciones y adaptaciones perdieron la capacidad de sintetizar la pared celular; a esto se debe a que son incapaces de sintetizar peptidoglicano. Al carecer de pared bacteriana toman la coloración de gram negativos y se tiñen mal con otros colorantes; como resultado de esta característica su morfología es extremadamente variable siendo pleomórficos, adoptando formas que varían desde esférica a ovoide o periforme, e incluso helicoidal (Poveda *et al*, 2002).

*M. hyopneumoniae* tiene un diámetro medio de 0,2 nm, rodeado por una membrana simple de 10 nm de grosor; posee una membrana plasmática trilaminar, citoplasma con ribosomas, gránulos citoplasmáticos y un núcleo constituido por moléculas bicatenarias de ADN y ARN (Andrada *et al*, 2001). A diferencia de las membranas bacterianas, la membrana de los *Mollicutes* contiene colesterol; y en su mayoría contienen fosfolípidos y glucoproteínas, que junto con las proteínas constituyen los determinantes antigénicos mas importantes (Poveda *et al*, 2002).

En la superficie externa de la membrana plasmática se aprecia una especie de cápsula, de naturaleza polisacárido; mediante diversas pruebas químicas se revela ultraestructuralmente una capa compacta, compuesta por proteínas y otra capa más externa, compuesta por carbohidratos. Estas proteínas confieren al micoplasma una porción hidrófoba mínima que favorece la adherencia a las células respiratorias mediante interacciones hidrofóbicas (Andrada *et al*, 2002).

Es un microorganismo de difícil cultivo. En la actualidad, se emplea para su aislamiento el medio de Friis modificado, introducido por Friis en 1971 y modificado por Ross y Whittlestone en 1983, por la adición de 8,1 % de suero porcino para mejor adaptación del micoplasma al cultivo (Ross, 2000; Andrada *et al*, 2002; Thacker E, 2001). Por lo general, los cultivos se pasan varias veces en caldo y luego se inoculan en medio sólidos y se incuban en una atmósfera de 5 -10% de dióxido de carbono.

El aislamiento del microorganismo es complicado debido a sus características nutricionales (Andrada *et al*, 2002), los requisitos de crecimiento son sumamente exigentes al igual que el *M hyorhinis* que es un agente secundario (metaboliza la glucosa y acidifica el medio) y se encuentra también presente en las neumonías del cerdo (Ross, 2000).

En caldos de cultivo primarios *M. hyopneumoniae* crece lentamente, produciendo una tenue turbidez y un cambio de color ácido entre 3 y 30 días de incubación (Andrada *et al.*, 2002). Las colonias son apenas visibles después de 2-3 días de inoculación, pero gradualmente incrementan su medida de 0.25 a 1 mm en aproximadamente 10 días (Ross, 1986). En medios sólidos los micoplasmas no tienen la característica propia de “huevo frito” a diferencia del desarrollo en medios especiales, donde los micoplasmas tienen tamaño variable (200-300 nm) mostrando una zona central opaca y una zona periférica translúcida (Rubin y Farber, 1990).

*M. flocculare* es un patógeno no común en pulmones de cerdo, muy similar al *M. hyopneumoniae* en cuanto a morfología, desarrollo y antigenicidad (Ross, 2000). A diferencia de *M. hyopneumoniae* y *M. flocculare* que requieren esteroides para su desarrollo y no presentan reacciones claras en la fermentación de la glucosa y manosa, son negativos a la hidrólisis de la arginina, urea y la actividad fosfatasa, y muestran variabilidad en la formación de películas, cristales y reducción del tetrazolium (Andrada *et al.*, 2002).

Los Micoplasmas tienen la capacidad de cambiar los antígenos de superficie (Ross, 2000). Con el pasar de los años y la biotecnología se ha podido codificar algunas proteínas inmunogénicas, incluyendo proteínas citosólicas como p36, de membrana p46, p65 y p74 y la adhesina p97 (Chang, 2001).

Artiushin y Minion en 1996 evidenciaron que existe heterogenicidad entre aislamientos de *M. hyopneumoniae*. Innumerables estudios indican la variación antigénica y genética de cepas de Micoplasma (Desrosiers, 2001).

Algunas proteínas de *M. hyopneumoniae* se han identificado que podrían estar involucradas en la patogenia de este agente, entre ellas se

encuentran: la p97 principal lipoproteína de superficie asociada a la virulencia (Janke, 1997; Zhang *et al*, 1995); la p102 proteína accesoria a la p97 que interviene también en el mecanismo de adhesión junto con la p110 (Chen *et al*, 1998; Hsu y Minion, 1998). La p36 proteína citosólica con actividad de lactato deshidrogenasa (Frey *et al*, 1994; Haldimann *et al*, 1993); las p46, p65 y p74 proteínas de membrana; la p72 involucrada en el sistema de la enzima transferasa (Chung *et al*, 2000); la p42, p60 y p70 son proteínas que pertenecen al grupo de las “Heat Shock Proteins” (Hsp) las cuales mantienen la integridad del agente y su función celular en situaciones de estrés (Chou *et al*, 1997 ; Sherm *et al*, 2002).

Otras proteínas de membrana como la p7413, la p7048, la p6523, la p467 y la p4026, son proteínas específicas que podrían usarse en el diagnostico de este agente (Andrada *et al*, 2001). Las proteínas p36 y p46 son proteínas con determinantes antigénicos especie específicos de *M. hyopneumoniae* no encontradas en otros micoplasmas comunes en los cerdos (Caron *et al*, 2000b).

Existen cepas patógenas y no patógenas de *M. hyopneumoniae*, siendo genéticamente diversas en la naturaleza, dividiéndose en 6 subgrupos epidemiológicos (Halbur, 1997); aunque según Thacker (2000) este agente no se clasifica por cepas, ya que carece de marcadores para diferenciarlos; sin embargo, existe variación antigénica entre estos (Desroisers, 2001). Posee similitudes antigénicas con *Mycoplasma flocculare*, así como, morfológicas y de cultivo, aunque éste no es normalmente un patógeno reconocido del cerdo. Para diferenciarlos hay que efectuar pruebas serológicas, basadas en el estudio de antígenos específicos (proteína lactato deshidrogenasa 36 kDa, 40, 43, 64, 74 y 97 kDa) de *M. hyopneumoniae* (Andrada *et al*, 2002).

## **2.3.- EPIDEMIOLOGÍA**

### **2.3.1.- AGENTE**

Los Micoplasmas son microorganismos pleomórficos, que varían desde formas esféricas, ligeramente cocoides o piriformes hasta filamentos helicoidales de 0.3 a 0.8  $\mu\text{m}$  de diámetro, pudiendo atravesar filtros entre 200 y 450 nm (Andrada *et al.*, 2002).

El *M. hyopneumoniae* resiste 30 minutos a 45°C, pero a 50°C se destruye en 5 minutos. Soporta la liofilización y temperaturas de -180°C. Desaparece del pelo y ropa en 48 horas en ambiente seco. Sobrevive bien en el agua de lluvia, hasta 17 días, a bajas temperaturas (2-7°C), lo que explicaría la transmisión aerógena por aire húmedo (Andrada *et al.*, 2002).

Presentan una estructura sencilla constituida por una membrana trilaminar (lípidos y una fracción de proteínas), citoplasma que contiene ribosomas, gránulos citoplasmáticos y un núcleo procariótico característico, constituido por moléculas bicatenarias circulares de ADN y moléculas de ARN (Andrada *et al.*, 2002).

*M. hyopneumoniae* con el pasar de los años ha disminuido su virulencia, pero esto es una dificultad que implica que la naturaleza inherente al microorganismo incluye la habilidad de cambios en el fenotipo y en la expresión de las proteínas de membrana dependiendo del medio en el que se desarrolla (Thacker y Thacker, 1999c).

### **2.3.2.- FUENTES DE TRANSMISIÓN**

Existen evidencias que *M. hyopneumoniae* es transmitido por aerosoles o por contacto directo con secreciones del tracto respiratorio de cerdos infectados (Janke, 1997). Goodwin en 1972a demostró que

el organismo podía ser aislado de hisopados traqueales de cerdos enfermos.

Los cerdos afectados, eliminan el agente en las secreciones respiratorias, infectando a los cerdos susceptibles que inhalan los aerosoles contaminados (Whittlestone, 1973). La propagación por aire a gran distancia se da en granjas separadas con distancias menores de 3.2 Km. (Goodwin, 1985).

Farrington (1976) y Etheridge *et al.* (1979a) demostraron que la transmisión del microorganismo ocurre entre porcinos jóvenes del mismo corral, sin embargo, no siempre la enfermedad tiene lugar entre animales del mismo corral (Goodwin, 1972b). Los que escapan a la infección en estadios tempranos de su vida pueden infectarse después cuando entran en contacto con otros porcinos en el destete o en fases de crecimiento y acabado (Janke, 1997).

Debido a la naturaleza del microorganismo y el gran tamaño del inóculo requerido para la transmisión experimental de la enfermedad, es que no se puede transmitir fácilmente, a menos que existan porcinos portadores (Ross, 2000).

En observaciones de campo se implicó a los porcinos portadores como la principal fuente de infección con *M. hyopneumoniae*. En un reporte de Pullar en 1948 encontró que en 190 piaras de cerdos australianos el 80% de los brotes estaba asociado a la introducción y comercialización de ganado y que solo el 20% fue asociado con introducción de lechones en las granjas.

En sistemas de producción continua, puede transmitirse *M. hyopneumoniae* y otros agentes patógenos respiratorios importantes en grandes cantidades de los cerdos adultos a los más jóvenes (Ross, 2000). El riesgo más alto de infección se encuentra en sistemas

continuos, debido a la incorporación continua de cerdos nuevos a la granja (Andrada, 2001).

En sistemas “todo dentro todo fuera” la transmisión se da principalmente en la etapa de lactación, mientras que en sistemas de destete temprano segregado se evita la transmisión cuando los lechones se destetan a los 9 días de edad (Clark, 1997).

La infección de las crías es principalmente a través de las madres (Camacho, 2004). La transmisión vertical (intrauterina) o lactogénica aún no ha sido demostrada (Andrada *et al.*, 2002).

Nuevos estudios han examinado la posibilidad de transmisión por semen; en Finlandia se encontraron 101 muestras de semen positivas a *M. hyopneumoniae* (Desrosiers, 2001).

### 2.3.3.- **HOSPEDERO**

*M. hyopneumoniae* es un microorganismo estrictamente del porcino (Andrada *et al.*, 2002). Se desconoce si existen otros hospederos de este microorganismo, así como la participación de otros animales en su transmisión (Armstrong, 1982).

Por otro lado, el hecho de que los animales no sean de una raza determinada influye también en la menor presentación de la enfermedad. Al respecto Gardner y Hird, (1990) al hacer un estudio sobre los factores determinantes de neumonía en porcinos beneficiados, indicó que la heterosis ofrecía protección contra la presentación de neumonía.

Porcinos de diferentes edades parecen ser igualmente susceptibles al microorganismo (Ross, 2000); sin embargo, existe



evidencia de diferencias en patrones de colonización entre crías de diferentes verracos, sugiriendo un posible efecto genético. (Ruiz, 2002).

Bajo condiciones de campo los animales jóvenes son más susceptibles a padecer de neumonía micoplasmal del cerdo (NMC), manifestandose escasamente en adultos (Andrada *et al.*, 2002).

Piffer y Ross en 1984, estudiaron el efecto de la edad sobre la susceptibilidad a *M. hyopneumoniae* en animales de 3, 6 y 12 semanas, los cuales estuvieron en contacto por 27 días con animales infectados y no se encontró diferencia significativa en la intensidad de lesiones pulmonares (Andrada *et al.*, 2002).

Las cerdas jóvenes con bajo nivel de inmunidad son las que infectan a sus crías con micoplasma; las cerdas adultas generalmente son inmunes y protegen a sus camadas por un período de seis semanas, pero cuando baja la inmunidad el micoplasma infecta a los lechones susceptibles (Morilla, 1997).

Los lechones se infectan a partir de las 4 semanas de edad y de 10 a 16 días posteriores desarrollan los signos (Taylor, 1986). Por lo general no se observan signos francos de NMC hasta que los lechones tienen 6 semanas de edad o más (Ross, 2000).

#### **2.3.4.- FACTORES AMBIENTALES**

La neumonía por micoplasma afecta mayormente a los cerdos, en los meses fríos y cuando se agregan factores predisponentes, tales como: humedad, ventilación, hacinamiento (Schifferli *et al.*, 1990), grado de microbismo o estado sanitario de la granja, balance nutricional, manejo de los animales, corrientes de aire directa, alta concentración de amoniaco y polvo en el aire (Camacho, 2004).

Se ha señalado que la temperatura y la humedad modifican la capacidad de penetración del microorganismo a los pulmones, porque alteran el tamaño de las partículas de aerosoles infectadas y el mecanismo protector de las vías respiratorias, además de alterar la sedimentación de dichas partículas (Blood, 1999). Los cerdos de crianza artesanal al ser sometidos a fluctuaciones de temperatura ambiental, corrientes frías y mala nutrición son por lo tanto más propensos a sufrir esta enfermedad (Ibarra *et al.*, 2000).

Los parámetros climáticos evaluados en los diferentes trabajos no tienen un efecto *per se*, sino que son consecuencia del manejo; así el amoníaco se produce por descomposición de heces y está más relacionado con la limpieza que con la ventilación. Los gases están relacionados entre sí con el microbismo. El amoníaco y el H<sub>2</sub>S están relacionados con la limpieza y son indicadores negativos de la ventilación (Donhnam, 1991). Por otro lado, el CO<sub>2</sub> se produce por la respiración de los cerdos y responde linealmente a la ventilación. Debido a esto, se utiliza este indicador interpretando, que niveles altos de CO<sub>2</sub> indican una deficiente ventilación o un exceso en la densidad de animales, y niveles muy bajos indican una alta ventilación que produce polvo, baja temperatura o pocos animales por superficie, indicando una utilización no óptima de las instalaciones (Andrada *et al.*, 2002).

#### **2.3.5.- ENFERMEDAD**

Largos períodos de incubación, la diseminación lenta del microorganismo en las camadas, el aumento de la densidad de animales, la diseminación de otros agentes infecciosos y factores del medio ambiente que se desarrollan después del destete contribuyen al pico de prevalencia de la enfermedad por *M. hyopneumoniae* en porcinos en crecimiento y acabado (Ross, 2000).

El primer momento de riesgo de la enfermedad se da en la primera semana de vida, cuando las crías tienen contacto con las secreciones nasales de la madre, siendo las primerizas las que diseminan el agente con mayor frecuencia que las multíparas. La segunda oportunidad se da luego del destete, cuando se mezclan porcinos negativos y positivos en el mismo ambiente. El tercer momento de riesgo se da cuando son trasladados a los corrales de engorde debido al estrés producido y a la mezcla con animales posiblemente infectados (Surprenant, 2001).

Es posible que el conjunto de factores capaces de desencadenar la enfermedad varíe dependiendo de la cepa involucrada, la carga bacteriana, factores de manejo, otros patógenos presentes, el número y densidad animales, susceptibilidad, medicación y vacunación, por lo que cada granja tiene su propio umbral (Casamiglia, 1999).

Goodwin (1965) sugirió que la presencia de *Mycoplasma* en las granjas no implica que se desencadene la enfermedad. Sin embargo, no se ha demostrado que dicho agente puede permanecer en poblaciones grandes de porcinos de crianza intensiva por muchos años sin producir enfermedad respiratoria (Casamiglia, 1999).

La enfermedad tiene dos formas de presentación, la aguda y la crónica (Camacho, 2004). La forma aguda presenta una mortalidad del 5% y una morbilidad de hasta 100%, aunque Hurley (1995) encontró una morbilidad de 7-11% (Ross, 1999). La forma crónica es la más común y se observa en las piaras infectadas en forma enzootica (Camacho, 2004).

La bibliografía refleja claramente que la NMC se encuentra distribuida a nivel mundial con un 90 a 95% de explotaciones afectadas y de un 70% a 100% de los animales infectados. Los trabajos

realizados en varios países indican que las lesiones típicas de la NMC ocurren de 30 a 80% en porcinos sacrificados (Andrada *et al.*, 2002).

El sistema de flujo continuo puede acelerar la diseminación de la enfermedad mucho más que un sistema todo dentro-todo fuera. Clark (1993), crió cerdos nacidos de una camada en estos 2 sistemas y observó al sacrificarlos, que los provenientes de un sistema todo dentro-todo fuera, no presentaban lesiones pulmonares o eran mínimas y se demostró que ganaron mas peso, en comparación con los criados en un sistema de flujo continuo.

En los Estados Unidos, un estudio de 337 granjas en 13 estados indicó que el 99% de los cerdos presentaban lesiones neumónicas (Andrada *et al.*, 2002); una encuesta reciente en Minnessota reveló que el 100% de 125 piaras tenían lesiones típicas de la “neumonía enzoótica” y el 75% de los cerdos estaban afectados. Sin embargo, Tielen, 1995 indicó que la prevalencia de neumonía en el momento del sacrificio en los Países Bajos ha disminuido del 23% en 1981 a 5.8% en 1990 (Ross, 2000).

En México, en la mayoría de las granjas de ciclo completo se han encontrado animales con anticuerpos, indicando que *Mycoplasma hyopneumoniae* es ubicuo (Morilla, 1997). Ibarra (2000) en el Perú, en un estudio realizado en granjas de crianza artesanal encontró que un 11.25% de los animales eran seroreactores positivos al *M. hyopneumoniae* y Huallanca (2001), y que el 12.2 % animales resultaron reactores positivos de un estudio realizado en un camal de Lima Metropolitana.

#### **2.3.6.- INFLUENCIA EN PARÁMETROS PRODUCTIVOS**

*Mycoplasma hyopneumoniae* causa un impacto negativo en los parámetros productivos de los porcinos de engorde, disminuyendo el promedio de ganancia diaria y la eficiencia de conversión alimenticia

(Morrison, 1984), produciendo desuniformidad y prolongando los días de salida al mercado ocasionando que las instalaciones sean ocupadas por más tiempo, reduciendo más el rendimiento, incrementando los costos y reduciendo los márgenes de ganancia (Valdivia y Calle, 1999).

La tasa de crecimiento en porcinos expuestos a hembras infectadas llega a reducirse hasta en 15,9% y la conversión alimenticia disminuye en 13,8% (Ross, 2000). En un estudio de campo realizado en porcinos de engorde, el efecto negativo en la ganancia diaria de peso por una infección natural con *M. hyopneumoniae* se estimó en 24 gr. o 2.9% del peso corporal (Tuovinen *et al.*, 1994); en Perú se reportó una disminución en la ganancia de peso de 10–15% (Valdivia y Calle, 1999). Además, las infecciones por *M. hyopneumoniae* adquiridas tempranamente durante la crianza, fortalecidas por factores medioambientales y de manejo disminuyen la ganancia de peso en los porcinos (Rautiainen *et al.*, 2000).

Las lesiones observadas en camal, pueden relacionarse en sólo un 9 –27% de la variación en aumento de peso promedio diario; sugiriendo que el 20–90% restante podría deberse a diversos factores: ambiente, alimento, genética y sistemas de manejo. Pijoan *et al* (1999) determinaron que por cada 10% de lesión pulmonar existe una disminución del 5% en la ganancia diaria de peso (Fuentes, 2000) mientras que, Scheidt *et al.* (1990) reportan por cada 10% de pulmón neumónico se disminuye en 37.3 gramos la ganancia de peso / día. El impacto en costos de las lesiones neumónicas debe calcularse a través de un minucioso examen en el camal.

#### **2.3.7.- COMPLEJO RESPIRATORIO PORCINO (CRP)**

El complejo respiratorio porcino (CRP) es un desorden respiratorio económicamente significativo (E. Thacker, 1999a),

caracterizado por crecimiento lento, disminución de la eficiencia alimenticia, letárgia, anorexia, fiebre, tos y disnea (Halbur, 1998). Aunque este complejo en cerdos se debe a la combinación de varios agentes, *M. hyopneumoniae* es considerado el más importante (Zhang *et al.*, 1995).

Recientes estudios revelan la importancia de *M. hyopneumoniae* en el complejo respiratorio porcino (CRP) como agente primario y el incremento de la severidad de otros patógenos respiratorios (Thacker *et al.*, 1999a).

La presencia concomitante de varios agentes en el pulmón es mas frecuente que la aparición de *M. hyopneumoniae* puro (Thacker, 2001). El CRP incluye al menos el virus del PRRS y a *M. hyopneumoniae* (Andrada *et al.*, 2002); a su vez se ha demostrado su sinergismo (Bosch, 2000).

Conjuntamente con *M. hyopneumoniae* se aíslan frecuentemente otros microorganismos que dan lugar a una infección neumónica secundaria. Así, Gois *et al.*, 1980 encontraron *M. hyorhinis* (64%), *Streptococcus spp.* (41%) (Andrada *et al.*, 2002), *Pasteurella multocida* (35%) (Clark, 1999), *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis*, *Actinomices pyogenes* (Thacker *et al.*, 1999c), *Actinobacillus pleuropneumoniae*, el virus de Pseudorabia (Desrosiers, 2001) e influenza porcina (SIV). Siendo frecuentemente hallados SIV y el virus PRRS (Thacker *et al.*, 1999b).

El efecto causado por la interacción entre *M. hyopneumoniae* y el virus de la Influenza Porcina es aditivo y transitorio en la naturaleza, con una interacción mínima entre estos dos agentes, debido a que la coinfección de un animal con micoplasma no altera significativamente el curso de la enfermedad causada por el SIV (E. Thacker *et al.*, 2001).

La mayoría de casos del CRP que se han estudiado en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad del Estado de Iowa, fueron positivos al virus del PRRS y presentaban lesiones microscópicas típicas de la infección con *M. hyopneumoniae* (Thacker *et al.*, 1999c).

En una infección mixta se han evaluado la reducción en la ganancia de peso de 16 a 30% y disminución en la conversión alimenticia de 14 a 20% (Thacker *et al.*, 1999c).

#### **2.4.- INMUNIDAD**

En el porcino, al igual que en el resto de mamíferos, la respuesta inmunitaria consiste en el reconocimiento de moléculas ajenas al organismo y en los mecanismos de defensa frente a ellas. Los principales mecanismos por lo que las bacterias extracelulares producen enfermedad se basan por un lado en su capacidad de producir endotoxinas o exotoxinas, y por otro lado, en los fenómenos inflamatorios que generan su presencia y multiplicación en las superficies orgánicas (Mateu de Antonio *et al.*, 1997).

El *Mycoplasma* emplea diversos medios para evadir los mecanismos de respuesta del hospedero, ya sea el sistema natural, sistema innato o inmunidad inducida por vacunas (Thacker, 1997).

Debido a que *M. hyopneumoniae* se encuentra exclusivamente en la superficie de las vías respiratorias, adherido a los cilios, es difícil estimular el sistema inmune (SI) y provocar una respuesta adecuada para que los productos de la respuesta inmunitaria alcancen niveles suficientes para eliminar el microorganismo (Calsamiglia, 1999).

*M. hyopneumoniae* posee vellosidades en su capa externa y una cápsula en la superficie que lo protegen de la células del sistema inmune

como los neutrófilos y macrófagos; pudiendo evadir el reconocimiento por el sistema inmune de memoria, ya que presenta proteínas de superficie o lipoproteínas que incrementan su habilidad de adherirse a las células hospedadoras; así mismo, puede desviar la respuesta inmune hacia una respuesta menos efectiva, lo que puede resultar en alteración de la respuesta a otros patógenos (E. Thacker, 2001).

Otros mecanismos también están involucrados en la protección del agente del sistema inmune, para evitar su destrucción; incluyendo, la activación de varias células blanco del sistema inmune como linfocitos y macrófagos, previniendo que los linfocitos respondan a sustancias que normalmente la activan (inmunosupresión) y liberando sustancias (citoquinas) que adicionalmente activan las células, evitando el desarrollo de mecanismos específicos de eliminación (E. Thacker, 1997).

La reacción inmune local con frecuencia provoca daños adicionales porque los complejos inmunitarios formados pueden provocar reacciones autoinmunes en los tejidos bronquiales y pulmonares (Plonart y Bickhardt, 2001).

#### 2.4.1.- **INMUNIDAD HUMORAL**

Las bacterias extracelulares como *Mycoplasma hyopneumoniae* usualmente estimulan una respuesta inmune humoral como principal mecanismo de respuesta inmune protectora (Thacker, 1997).

La respuesta inmunológica inducida por el *Mycoplasma hyopneumoniae* es de tipo humoral principalmente produciéndose IgM e IgA, seguidas por IgG, los anticuerpos fijadores del complemento, básicamente IgM se encuentran muy temprano (Carter, 1991). La inmunidad local, especialmente la IgA secretora, se considera importante en la infección por este agente (Blood *et al.*, 1999); siendo



esta inmunoglobulina predominante en el tracto respiratorio alto del porcino, aunque con niveles muy bajos.

Se ha demostrado que en una población existe variación biológica en la fuerza de la respuesta inmune humoral (RIH) entre individuos con igual estímulo antigénico (Stevenson, 1999), además no existe correlación entre protección y nivel de anticuerpos séricos (Thacker, 1999b), pero existe asociación de la inmunidad humoral contra *M. hyopneumoniae* y la neumonía (Cornaglia, 2002).

La inmunidad pasiva juega un papel importante en la enfermedad, en el momento de presentación y severidad de la infección (Thacker, 1999b). Esta inmunidad materna puede inhibir el desarrollo de las respuestas local y sistémica, demorando así el desarrollo de la neumonía micoplásmica (E. Thacker, 2001), teniendo un mínimo o nulo impacto en el nivel de infección (B. Thacker y E. Thacker, 2001).

Durante la gestación, los anticuerpos protectivos son transferidos de la sangre a la ubre durante el último mes (Wallgren 1998). Los niveles de anticuerpos contra *M. hyopneumoniae* en lechones se relacionan estrechamente con los de su madre; es así, que marranas viejas (más de 5 partos) tienen hasta 3.3 veces mayor cantidad de anticuerpos que las cerdas jóvenes (Rautiainen, 2001), siendo importante por ello, el número de partos y la historia de la madre al interpretar los resultados, por lo que inmunizar a las madres incrementaría hasta tres veces más el título de anticuerpos en sus lechones independientemente del número de partos (Clark, 1999).

Los anticuerpos calostrales contienen altos niveles de inmunoglobulinas, predominando la IgG; los lechones absorben los anticuerpos principalmente las primeras seis horas y el cierre

intestinal para la absorción de inmunoglobulinas intactas ocurre a las 18 horas (Bazer, 2001).

La vida media de los anticuerpos adquiridos pasivamente es de 16 días, disminuyendo entre los 30 y 63 días de edad, dependiendo de la concentración inicial de los mismos, variando entre las diferentes granjas (Blood *et al*, 1999).

En hatos positivos a *Mycoplasma hyopneumoniae* las hembras transmitirán anticuerpos maternos a su descendencia vía calostro, los cuales bajo circunstancias normales decrecerán gradualmente hacia las seis semanas de edad (Thacker, 1997).

Los anticuerpos maternos tienen un impacto mínimo en el nivel de infección (B. Thacker y E. Thacker, 2001) y pueden proveer protección parcial contra el desarrollo de lesiones pulmonares hasta las primeras seis semanas de vida (Jayappa *et al*, 2001; Desroisers, 2001); pero posiblemente no previenen un reto tardío (Burch, 2003b).

En un estudio realizado en el Perú se pudo ver que la persistencia de la inmunidad materna alcanzó las 8 semanas de edad en el 43.3% de los animales; el mayor porcentaje de animales infectados seroconvirtieron a las 12 semanas de edad, indicando que la actividad del micoplasma se inicio al final de la etapa de recría, alrededor de las 9 semanas de edad (Torres, 2003); encontrándose esto dentro de los límites establecidos por Joo (1988) que estableció el tiempo de seroconversión entre las 10 – 16 semanas de edad, sugiriendo que la infección natural ocurre durante la etapa de recría entre las 4 a 12 semanas de edad.

Se desconoce que induce la seroconversión contra *M. hyopneumoniae*, pero es probable que ocurra cuando el número de

estos microorganismos alcance niveles críticos, o cuando el daño en el tracto respiratorio causado por otros patógenos exponga al agente al sistema inmune (E. Thacker, 2001).

La seroconversión se observa comúnmente unos días después de la infección, pudiendo darse después de unas semanas (León *et al.*, 2001). La tos se presenta al momento de la seroconversión; además, las lesiones macroscópicas de neumonía están asociadas a la seroconversión; Stijar *et al.* (1996) en un estudio demostró, con el uso de radiografías de tórax y monitoreando anticuerpos contra *M. hyopneumoniae*, que el pico de severidad de las lesiones pulmonares está asociado al momento de la seroconversión, siendo su mayor índice entre los 3 y 4 meses de edad (Blood *et al.*, 1999).

El contacto directo entre cerdos de 9 a 11 semanas con cerdas seropositivas produce seroconversión frente al microorganismo, primero a los 21 días siendo mas frecuente que ocurra aproximadamente a las 11 semanas después del contacto (Blood *et al.*, 1999).

En infecciones experimentales, la seroconversión tiene lugar entre las 2 y las 5 semanas después de la inoculación (Suter *et al.*, 1985), o a las 9 semanas en animales en contacto (Armstrong *et al.*, 1983). En casos de infección natural, el tiempo de seroconversión es más tardío y variable (Sitjar *et al.*, 1996; Calsamiglia *et al.*, 1999).

En infecciones a las seis semanas de edad los anticuerpos aparecen a las tres semanas postinfección, alcanzando el pico máximo a las 8 semanas y luego descienden progresivamente hasta desaparecer al año después de la infección. En animales infectados a las dos semanas de edad, aparecen anticuerpos a las dos semanas

seguidas a la infección, siendo además mayor la tasa de anticuerpos que cuando se infectan a las 8 semanas.

La inmunidad activa adquirida artificialmente protege a los porcinos e incrementa su promedio de ganancia diaria de peso (GDP) comparado con los animales que no reciben la vacuna, además de reducir las lesiones pulmonares causada por este agente (Siugzdaite y Garlaite, 2002).

La inducción de anticuerpos séricos por vacunas tiende a ser lenta, la seroconversión suele ocurrir dos semanas postvacunación; estos niveles de anticuerpos séricos declinarán poco después, haciéndose los porcinos seronegativos aproximadamente entre las 4 y 6 semanas postvacunación (E. Thacker, 1999a). Además, estos niveles séricos postvacunales, no se correlaciona con un alto grado de protección, ni con una mayor duración de la misma; incluso varía de uno a otro individuo (Suprenant, 2001).

#### 2.4.2.- INMUNIDAD CELULAR

La respuesta mediada por células produce linfocitos que destruyen los organismos ya sea directamente o por aumento en la producción de anticuerpos por los linfocitos B (Thacker, 1997).

*Mycoplasma hyopneumoniae* incrementa el nivel de citoquinas proinflamatorias (macrófagos), como las IL-1( $\alpha$  y  $\beta$ ), IL-6 que inducen una inflamación más amplia y daño tisular (Thacker *et al.*, 1999a). Aparentemente esto se relaciona con el aumento de calcio producto de la infección de las células epiteliales ciliadas (E. Thacker, 1999b). Estas citoquinas son producidas por macrófagos y monocitos e inducen una inflamación local; el mecanismo por el cual activa estas células es desconocido (E. Thacker, 2001).

Varias proteínas de superficie sobretodo lipoproteínas, juegan un rol sobre la activación de los macrófagos y linfocitos. Inversamente, el organismo puede suprimir la reactividad del linfocito, pudiendo ligar no específicamente inmunoglobulinas, y elaborar proteasas capaces de dividir a la IgA (Janke, 1997).

*Mycoplasma hyopneumoniae* desvía la respuesta inmunológica de tipo T helper 1 (Th1), en el cual los macrófagos se activarían para fagocitar y destruir a los microorganismos, hacia una respuesta predominantemente T helper 2 (Th2), la cual es probablemente menos efectiva en controlar y eliminarlo, pudiendo resultar en la alteración de la respuesta inmunológica a otros patógenos (E. Thacker, 2001). Esto podría deberse, a que *M. hyopneumoniae* estimula la producción de citoquinas mediadas por células T, como IL-2, IL-4 e IFN  $\gamma$ , que tienen aspectos amplificadores de linfocitos y afectan el balance entre las subpoblaciones de Th1 y Th2 (Rottem y Naot, 1998).

Este agente además, estimula la producción de Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ ) en los fluidos bronquioalveolares, así como de la producción de Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) específico a *M. hyopneumoniae* (E. Thacker *et al*, 2000).

Se ha comprobado que porcinos expuestos, no inmunizados presentan mayor concentración de TNF- $\alpha$  en el fluido bronquio alveolar, en comparación con animales expuestos e inmunizados (B. Thacker y E. Thacker, 2001). Además, la inmunización activa con bacterina estimula respuestas en las células linfoides del bazo, nódulos linfoides y sangre periférica de porcinos vacunados; aumentando las células CD8<sup>+</sup> (supresoras) en órganos linfoides periféricos; células CD4<sup>+</sup> (activadoras) en los nódulos linfoides bronquiales y grandes cantidades de células CD16<sup>+</sup> (activador de

células asesinas naturales) en lavados bronquioalveolares (Bhogal *et al.*, 1992).

Por otro lado, células micoplásmicas tienen interacción con células linfoides. Las membranas del microorganismo resultan ser mitógenas para linfocitos de porcinos **in Vitro** (Messier y Ross, 1991), los porcinos infectados tienen alteraciones de la función macrófago alveolar (Ross, 2000).

Tajima *et al.* (1984), encontraron que las lesiones neumónicas eran menos severas en porcinos que habían sido timectomizados, sugiriendo la importancia del mecanismo de inmunidad mediada por células en el desarrollo de las lesiones neumónicas (Thacker *et al.*, 1999c). Sin embargo, dos estudios de la respuesta de inmunidad mediada por células en cerdos mostraron inconsistencia **in Vitro** en la estimulación de linfocitos por vacunación con antígenos de *M. hyopneumoniae* (Thacker *et al.*, 1998).

## **2.5 FISIOPATOLOGÍA**

Las superficies mucosas son la principal vía de entrada y el principal sitio de infección de muchos agentes infecciosos; entre ellos *Mycoplasma hyopneumoniae*. El punto central sobre el que se orientan la mayoría de los estudios de la patogenia de esta enfermedad es la interacción entre el micoplasma y la membrana citoplasmática de las células epiteliales de las vías respiratorias (Andrada *et al.*, 2002).

El proceso de virulencia de los micoplasmas es complejo e involucra la unión/colonización, citotoxicidad, competición por el sustrato, así como la evasión y modulación de la respuesta inmune del hospedador (Ross, 2000).

Estudios realizados usando hibridización **in situ**, detectaron la presencia del agente en la superficie del epitelio celular de bronquios y

bronquiolos pero no en el citoplasma de estas células, lo que contribuye a pensar que *M. hyopneumoniae* es una bacteria extracelular; aunque una íntima adherencia entre el agente y el epitelio es importante (Kwon *et al.*, 2002). Su presencia sobre la mucosa del aparato respiratorio disminuye en el curso de la enfermedad, llegando prácticamente a desaparecer en las fases más avanzadas de la misma, pudiendo persistir o potenciarse su permanencia cuando está asociado a otras bacterias secundarias (Andrada *et al.*, 2002).

El periodo de incubación es en promedio de 10–16 días en condiciones naturales, sin embargo, se han encontrado una variación considerable en la duración (Ross, 2000); dependiendo de la exposición de los animales susceptibles y de la virulencia de la cepa comprometida, desarrollándose lesiones pulmonares evidentes a partir de los 7 a los 10 días después de la infección (Andrada *et al.*, 2002). El inicio de la enfermedad probablemente dependa de la intensidad de la infección en las superficies de las mucosas traqueal y bronquial. La enfermedad se disemina lentamente y la manifestación clínica puede darse entre los 3 – 6 meses (Ross, 2000).

*Mycoplasma hyopneumoniae* coloniza la superficie de las células ciliadas de la tráquea, bronquios y bronquiolos de los porcinos, sin invadir las células epiteliales (Amanfu *et al.*, 1984; Ross, 1992); además, su presencia en el tracto respiratorio alto; así como, en la cavidad nasal es transitoria (E. Thacker, 2001). Existe una íntima adherencia del microorganismo a los cilios durante la infección (Zhang *et al.*, 1990); que es de importancia en la patogenia de la enfermedad, ya que es el grado de adherencia es el que determina la patogenicidad de las diferentes cepas de *M. hyopneumoniae* (Andrada *et al* 2002).

Debido a que los micoplasmas carecen de pared celular, pili, adhesinas y otras estructuras extracelulares, la adherencia a las

superficies mucosas por este microorganismo involucra estructuras externas a la membrana menos organizadas. En efecto, las adhesinas del micoplasma parecen estar como simples proteínas incrustadas dentro de la membrana. En algunos casos, las adhesinas parecen estar organizadas en dominios de unión en la superficie de la membrana (Razin y Jacobs, 1992).

Estudios “**in vitro**” e “**in vivo**” han demostrado que *M. hyopneumoniae* se adhiere sólo a la superficie de células ciliadas del tracto respiratorio, pero no a la superficie de las células no-ciliadas (Blanchard *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1990; Mebus y Underdahl, 1977; Zielinski *et al.*, 1993). Estos datos indican que en el epitelio ciliado del tracto respiratorio porcino existen una cantidad considerable de receptores para el *M. hyopneumoniae*.

La adherencia de los micoplasmas a la superficie de la célula hospedadora puede interferir con los receptores de membrana o puede alterar mecanismos de transporte de la célula hospedadora. La invasión de *M. hyopneumoniae* produce cilioestasis y pérdida de cilios; la cilioestasis se debe a la disrupción por el agente en los canales de K<sup>+</sup> del epitelio ciliado bronquial despolarizando la membrana (Rottem, 2003); la pérdida de cilios podría deberse a un aumento en la concentración de calcio en el medio producido por micoplasma, comprometiendo así el mecanismo de defensa (Zhang *et al.*, 1994) además, de una exfoliación mecánica de los cilios debido al aumento en la actividad mucociliar. Este proceso se observa entre las 2 a 6 semanas postinfección, principalmente en la región media de la tráquea y en la superficie de los bronquios, posteriormente en los bronquiolos y lóbulos craneoventrales pulmonares (Blanchard *et al.*, 1992).

Las cepas patogénicas de *M. hyopneumoniae* incrementan el calcio en las células ciliadas de la tráquea, las cuales poseen un nivel basal de



calcio; a diferencia de las cepas no patogénicas; lo cual indica que la unión a los cilios puede ser un prerrequisito para la inducción del flujo de calcio (Park *et al.*, 2002).

Se ha reconocido una proteína de membrana denominada p97 que se cree, está involucrada en la adhesión del micoplasma a la superficie celular; y puede representar una proteína de variable tamaño encontrada normalmente en la superficie de los micoplasmas, sobretodo en la capa rizada (Rosengarten y Wise, 1991; Wise *et al.*, 1993; Yogev *et al.*, 1994) la mayor región antigénica parece encontrarse en la región terminal C de la proteína; aunque existen regiones putativas en otra regiones de la proteína. Aún se desconoce si la p97 se encuentra asociada a otras proteínas en la superficie del micoplasma o se une directamente al glicocalix (Hsu *et al.*, 1997); esta variación antigénica es un mecanismo por el cual el micoplasma evade el sistema inmune (Zhang *et al.*, 1995). En un estudio realizado por Hsu y Minion (1998) encontraron que en la region1 (R1) de la secuencia de la p97 se encontraba la actividad de unión a los cilios (adherencia), esta región varía entre las cepas existiendo así cepas de baja, mediana y alta actividad adherente, además se sospecha que otras proteínas o factores independientes de la p97 están implicados en la adherencia a los cilios.

Otras proteínas que intervienen en la patogénesis de *M. hyopneumoniae* son la p46 que estimula una respuesta inmune temprana en el cerdo y es específica de *M. hyopneumoniae* (Mori *et al.*, 1987; 1988) y la p36 que se ha caracterizado como una lactato deshidrogenasa (Haldimann *et al.*, 1993), la cual induce una respuesta inmune temprana en los cerdos infectados; además esta proteína se conserva bien entre las diferentes cepas de *M. hyopneumoniae* (Stipkovits *et al.*, 1991; Strasser *et al.*, 1991). La p36 aunque es antigénica, por ser una proteína citosólica y no de membrana, es

débilmente inmunogénica y no desencadena una respuesta inmune eficiente (Caron *et al.*, 2000b).

*M. hyopneumoniae* una vez adherido a los receptores celulares estimula la proteína G activando la vía de la fosfolipasa C (PLC) incrementándose el calcio a través de la liberación de este en el retículo endoplasmático; sin embargo, la adhesina p97 no aumenta la concentración de calcio, pero existe una proteína aún desconocida que media este efecto (Hsu y Mnion, 1998).

La adherencia de los micoplasmas aparentemente produce un daño oxidativo a la membrana celular del hospedero por radicales peróxidos y superóxidos (Almagor *et al.*, 1986), además el contacto íntimo entre los micoplasmas y la membrana celular puede resultar en hidrólisis de los fosfolípidos de la célula catalizados por las potentes fosfolipasas presentes en algunas especies de micoplasmas. Esto podría desencadenar las señales de cascada específicas o liberar lisofosfolípidos citolíticos capaces de interrumpir la integridad de la membrana celular (Rottem, 2003).

Por poseer un genoma muy pequeño, *M. hyopneumoniae*, tiene opciones metabólicas de supervivencia y replicación limitadas; ya que en su proceso evolutivo han ido perdiendo la mayoría de genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos y cofactores; por ello, dependen del microambiente del hospedador para proveerse de nutrientes, esta competencia por nutrientes o precursores biosintéticos puede alterar la integridad de la membrana celular del hospedero y su función celular (Rottem, 2003).

Estudios previos indican que algunos carbohidratos y glicoconjugados, incluyendo dextran sulfato, heparina, fucoidan, condroitín sulfato, mucina y laminina, inhiben la adherencia de los

micoplasmas a las células ciliadas del tracto respiratorio porcino; determinando que estos glicoconjugados en la superficie ciliar están envueltos en la adherencia de los micoplasmas, aunque la naturaleza de los glicoconjugados no ha sido establecida (Zielinski *et al.*, 1990). Sin embargo, el más involucrado en esta adherencia es el dextran sulfato, además la laminina (glicoproteína de la membrana celular encargada del crecimiento celular, diferenciación y migración) unida a los receptores (La, Lb, Lc) en la superficie de las células ciliadas bloquea la adherencia de los micoplasmas a la superficie de los 3 receptores ciliares, aunque no interactúa con los micoplasmas directamente, sino con los receptores ciliares. El mecanismo por el cual *M. hyopneumoniae* daña las células ciliadas es aun desconocido (Zhang *et al.*, 1994).

Otro evento importante es la interacción del micoplasma con células linfoides, ya que las membranas de *M. hyopneumoniae* son mitogénicas para linfocitos porcinos **in vitro** (Messier y Ross, 1991; Kwon *et al.*, 2002), y los cerdos afectados con el microorganismo tienen alteraciones de la función del macrófago alveolar (Caruso y Ross, 1990) y están inmunosuprimidos.

Debido a su tamaño diminuto y plasticidad, adapta su forma, para conformarse en los contornos de la superficie de la célula hospedadora; su forma filamentosa con sus organoídes de fijación terminal diferenciados, le permiten localizarse en las criptas y entre las microvellosidades y cilios, donde se encuentran protegidos de la fagocitosis (Wolfgang *et al.*, 1997).

<Aunque el micoplasma burle la fagocitosis, parece interactuar con polimorfonucleares (PMN) y células mononucleares, suprimiéndolas o estimulándolas por una combinación de efectos directos e indirectos mediados por citoquinas tales como IL-1, IL-6 y TNF  $\alpha$ ; induce además la formación de quimioquinas como, la proteína 1-quimioatrayente de

monocitos (MCP-1), proteína  $1\alpha/\beta$  inflamatoria de macrófago (MIP- $1\alpha/\beta$ ), factores estimulantes de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSFs), prostaglandinas y metabolitos activos de oxígeno y nitrógeno (Rottem y Naot, 1998). Estudios de hibridización **in situ**, revelaron que este agente puede infectar macrófagos pulmonares, siendo la destrucción de los mismos un indicador de su efecto patogénico (Maes, 1996). Además, este agente con las moléculas liberadas en el plasma aumentan la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo I y II, y coestimula la adhesión celular de leucocitos y células endoteliales, induciendo reclutamiento y extravasación al sitio de infección y provocando daño tisular local (Rottem y Naot, 1998)

*M. hyopneumoniae*, utiliza varios mecanismos para evadir la respuesta inmune; puede variar su tamaño, a través de la adición o sustracción de repetidas secuencias genéticas, como estrategia para evadir la respuesta humoral (Neyrolles *et al.*, 1999); varía la expresión de las proteínas a nivel genético, a través de un mecanismo de expresión o no expresión de genes; es así como el mimetismo molecular y la variación antigénica evitan que el sistema inmune reconozca eficientemente al micoplasma (E. Thacker, 2004; Rottem y Naot, 1998).

*M. hyopneumoniae* no secreta directamente una sustancia tóxica que se difunda en el epitelio ciliar; sin embargo, una toxina puede ser la responsable de inducir la infiltración linfocítica peribronquial (Livingston *et al.*, 1972; Underdahl *et al.*, 1980), cambio en la afinidad de la lecitina al epitelio bronquial (Ackermann *et al.*, 1991) o alteraciones histoquímicas de la secreción de mucus por las células (DeBey *et al.*, 1992) en el cerdo infectado.

Para que el micoplasma produzca citotoxicidad debe haber un contacto directo de este con la células ciliadas (DeBey, 1992); por consiguiente es posible que las adhesinas no sólo sean mediadoras de la

adherencia, sino también parecen tener efectos patogénicos en las células ciliadas, por mecanismos aun desconocidos. Se sabe que la infección por *M. hyopneumoniae* eleva el nivel de calcio citosólico en los neutrófilos (Debey *et al.*, 1993). Además, el efecto citopático sobre la célula no sólo se atribuye, a la capacidad de adhesión, sino también a una competencia metabólica entre el agente patógeno y la célula epitelial. La muerte celular consiguiente y su descamación provocan, como respuesta, una hiperplasia epitelial que intenta reparar la pérdida de las células (Kobisch y Friis, 1996).

Una vez que los cilios se han perdido, la protección de la mucosa disminuye y permite la adherencia a las partes fijas de las células del tracto respiratorio (Brown *et al.*, 1974). Además, se descama el epitelio y con el tiempo el agente se multiplica y avanza por el árbol bronquial; desarrollándose la neumonía (Ross, 1992).

Las células inflamatorias y los fluidos, principalmente macrófagos alveolares y linfocitos B, se infiltran en los tejidos pulmonares; la gravedad hace que estos se sedimenten y llenen el tejido pulmonar de los lóbulos craneoventrales, lo cual oblitera la luz bronquial; por lo que la resistencia respiratoria se ve disminuida desde 1.08 (normal) hasta 0.6 (Camacho y Calle, 2003). Esto lleva al animal a toser persistentemente, disminuyendo su tolerancia al ejercicio (Blood, 2000).

En un estudio **in vitro**, realizado por Zielinsky y Ross (1993) demostraron que alguna cepas de *M. hyopneumoniae* reducían su capacidad de producir neumonía en los porcinos, mientras que otras cepas seguían causando lesiones; esto puede ser debido probablemente a que se pierde la habilidad para adherirse a los cilios o que exista un crecimiento selectivo de poblaciones de micoplasmas no citotóxicos (DeBey y Ross, 1994).

La patogénesis de la neumonía micoplasmal es dependiente no sólo del daño directo causado a los cilios, sino también del daño a las células del sistema inmune del hospedador (Messier *et al.*, 1990).

## 2.6 SIGNOS CLÍNICOS

Los signos clínicos de la NE son variables según la fase evolutiva de la enfermedad, pero siempre se observan en un grupo de animales y no en forma individual, los signos se exacerban por condiciones de estrés y/o por infecciones secundarias, pudiendo llegar estas complicaciones a originar la muerte de los animales afectados (Andrada, 2001).

El principal signo clínico es una tos crónica, improductiva (Clark, 1999). Sin embargo en infecciones naturales agudas, se observa anorexia, respiración con soplo, hipertermia moderada e inapetencia (Andrada, 2001).

La enfermedad se presenta de manera gradual, empieza pasado el primer mes (a partir de 6 días post infección) y la tos continúa durante unas semanas (presenta un pico a los 27 días post infección) o incluso meses (Andrada, 2001), aunque algunos porcinos afectados presentan poca tos o nada (Clark, 1999). La intensidad en la tos es con frecuencia máxima en porcinos en crecimiento y acabado. Los movimientos respiratorios son normales, a menos que haya compromiso extenso del pulmón, en especial por infección bacteriana secundaria (Ross, 2000).

La caracterización adecuada de los varios estadios degenerativos de la enfermedad, es necesaria, debido a que las infecciones secundarias con bacterias, virus y parásitos, comunes en casos de enfermedad en situaciones de campo, pudiendo alterar las lesiones, resultando en severos cambios morfológicos (Roberts *et al.*, 1962). Animales con infecciones bacterianas secundarias pueden manifestar inapetencia, tos constante, fiebre, postración y respiración dificultosa (Ross, 1999).

Según evolucionan en forma crónica, los signos van desapareciendo, primero la hipertermia y en algunos casos la tos (Andrada, 2001). La mayoría de cerdos con NE no evidencian malestar, pero no crecen y su pelaje es anormal, puede haber retardo en el crecimiento, aunque el apetito es normal (Ross, 2000).

Otros signos clínicos relacionados con la infección son poco frecuentes, aunque algunos trabajos hacen mención de artritis, cojera y lesiones serofibrinosas relacionadas con la virulencia de la cepa utilizada (Andrada, 2001).

La muerte asociada con infección bacteriana secundaria y estrés puede ocurrir entre los 4 y 6 meses de edad. Los animales con “brote secundario” pueden evidenciar inapetencia, respiración dificultosa, aumento en la tos, temperaturas elevadas y postración (Ross, 2000).

## **2.7.- LESIONES**

Encuestas realizadas a nivel mundial, indicaron que las lesiones típicas de la neumonía micoplasmal ocurren en 30-80 % de porcinos en edad de venta al camal (Ross, 2000).

Durante el inicio de la enfermedad, los lóbulos se presentan ligeramente inflamados y brillantes, de color púrpura, con una consistencia firme y más pesada que el tejido normal. En esta fase de la infección los pulmones son órganos ideales para el diagnóstico por que el microorganismo se encuentra en grandes cantidades (Armstrong, 1982).

Las lesiones macroscópicas consisten en áreas de consolidación de color púrpura (agudo) a gris (crónico) (Thacker *et al.*, 1999). Las lesiones se encuentran casi siempre en las porciones ventrales de los lóbulos craneales y medio, el lóbulo accesorio y la porción craneal de los lóbulos caudales de los pulmones (Ross, 2000).

El aspecto de los pulmones afectados semeja a pulmones atelectásicos sobre todo en la fase crónica de la enfermedad. En las fases tempranas y medias de la enfermedad existe un exudado catarral en las vías aéreas. Los ganglios linfáticos bronquiales y mediastínicos están a menudo agrandados (Ross, 2000).

Todas las especies de Micoplasmas, y en particular *M. hyopneumoniae*, son la causa más frecuente de pericarditis fibrinosa observado en porcinos sacrificados en camal (Desrosiers, 2001).

El examen radiográfico de pulmones de cerdos de 21 a 150 días de edad y el examen macroscópico de los pulmones tras el sacrificio revelan que las lesiones avanzan y retroceden dinámicamente a lo largo de la vida de los animales; así como, el examen en el matadero es un indicador inadecuado para determinar la neumonía que el animal sufrió durante toda su vida (Blood, 1999).

Las lesiones microscópicas en fases tempranas se caracterizan por la pérdida de cilios, exfoliación de las células ciliadas y una pequeña acumulación de neutrófilos en la luz y alrededor de las vías aéreas, así como en los alvéolos (Ross, 1986). Se observan linfocitos y monocitos que infiltran la adventicia de arteriolas y alrededor de las vías aéreas (Thacker, 2001a). A medida que la enfermedad progresa, aumenta el número de linfocitos en los tejidos perivascular, peribronquial y peribronquiolar, así como en la lámina propia de las vías aéreas (Dungwoth, 1993).

Los alvéolos pueden contener líquido de edema, eosinófilos y grandes cantidades de las células mononucleares, septales y polimorfonucleares. Alrededor de los 15-20 días hay formación de manguito o hiperplasia linfoide alrededor de las vías aéreas, acumulaciones más extensas de líquido inflamatorio de edema, grandes



células mononucleares y otras células inflamatorias en alvéolos y engrosamiento de los tabiques interalveolares (Ross,2000).

En estados crónicos se observa una hiperplasia linforeticular (Dungwoth, 1993) peribronquial y perivascular (Ross, 1986), así como el adelgazamiento del septo interalveolar. En estados de convalecencia se observa colapso alveolar, enfisema y se puede observar una intensa hiperplasia linfonodular (Ross, 1986; Dungwoth, 1993). Se observa neumonía intersticial y las vías respiratorias llenas de detritus celular (Thacker E., 2004).

La hiperplasia del linfoide es una característica histológica dominante de la lesión pulmonar inducida por *M. hyopneumoniae*, lo cual fue confirmado mediante la técnica de hibridación **In Situ** (Kwon, 1999). Este efecto mitógeno resulta en la alteración de la función del sistema inmune, puede ser un factor contribuyente a la hiperplasia masiva de tejido linfoide alrededor del tracto respiratorio y vasos sanguíneos (Messier, 1991). La hiperplasia por si sola puede estar relacionada con los signos clínicos debido a que la presión de los agregados linfoides pueden obliterar el lumen de la pared bronquial y causar el colapso de los alvéolos circundantes (Baskerville, 1981).

## 2.8.- **DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* es complejo, sobretodo debido a las exigencias del microorganismo para el desarrollo en cultivo y el tiempo en estos medios; por ello una serie de pruebas de laboratorio pueden usarse para detectar el agente en los porcinos. Sin embargo, las pruebas de laboratorio por si sólo, no ofrecen un diagnóstico certero y el diagnóstico definitivo de este agente solo se da por aislamiento del agente de pulmones neumónicos; sin embargo, el diagnóstico de Laboratorio no es concluyente en este proceso, debido a la presencia del agente en animales completamente sanos. Por ello, es

importante una correlación entre el aislamiento del microorganismo o la presencia de anticuerpos en suero y la enfermedad clínica; así como la reducción de la performance del porcino, nos orientan hacia un diagnóstico definitivo de este agente (Thacker E., 2001).

Actualmente, la mayoría de los laboratorios trabajan con métodos serológicos (detección de anticuerpos); estos métodos además de permitir muestrear un gran número de animales, permiten conocer con más exactitud que las anteriores la prevalencia y la dinámica del comportamiento de la enfermedad dentro de una explotación; así como el momento de exposición al agente. Permiten también, comprobar la eficacia de los programas de control, programas de vacunación y junto con el diagnóstico anatomopatológico evaluar los programas de erradicación.

#### **2.8.1 AISLAMIENTO BACTERIANO**

Para el aislamiento bacteriano se requiere un medio especial de cultivo, el que contiene suero porcino negativo a *M. hyopneumoniae*. El desarrollo es lento, frecuentemente toma de semanas a meses. La presencia de bacterias contaminantes, especialmente *M. hyorhinis* puede inhibir el crecimiento de *M. hyopneumoniae*. Estas características hacen impráctico su aislamiento y se considera como una herramienta pobre de diagnóstico. Aun así, el cultivo de *M. hyopneumoniae* sigue siendo la regla de oro para la detección de este microorganismo (Thacker E., 2001).

Fallas en el aislamiento de este microorganismo en condiciones de campo no deben ser empleadas como prueba para confirmar o negar su presencia en la piara (Thacker E., 2004).

En medios de caldo de cultivo desarrolla lentamente, produciendo turbidez poco definida y cambio de color debido a la

presencia de acidez, observada después de 3 a 30 días. El *M. hyopneumoniae* requiere esteroides para su crecimiento, fermenta glucosa, pero no hidroliza la arginina o urea. *M. flocculare*, contaminante común de pulmones suinos, tiene muchas similitudes morfológicas, de crecimiento y antigénicas con el *M. hyopneumoniae* (Ross, 1986).

## **2.8.2.- PRUEBAS DE LABORATORIO QUE DETECTAN ANTÍGENOS**

### **2.8.2.1.- ANTICUERPOS FLUORESCENTES**

Se basa en detectar antígenos de *M. hyopneumoniae* en vías aéreas de pulmones infectados. Estos ensayos requieren tejido pulmonar congelado. La practicidad de uso de este ensayo es cuestionable ya que los pulmones deben ser enviados al laboratorio en buen estado para dar resultados óptimos (Thacker E., 2001a).

La desventaja de esta prueba es que no puede detectar el antígeno en infecciones de menor grado en porcinos crónicamente infectados y se requiere para el examen contar con un microscopio de fluorescencia (Halbur, 1997).

### **2.8.2.2.- INMUNOHISTOQUÍMICA**

Este ensayo también detecta antígenos (Ag) de *M. hyopneumoniae*, ha sido desarrollado en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad del Estado de Iowa y puede ser evaluado en fragmentos de tejido en formalina (Thacker E., 2001a).

Se usa para el diagnóstico de otros patógenos como el virus del PRRS, Influenza y Coronavirus. Permite observar la presencia de antígeno en las células apropiadas en relación con la típica

lesión microscópica. La presencia del antígeno y lesiones consistentes con la enfermedad inducida por el patógeno, permiten el diagnóstico en 24 horas (Halbur, 1997).

Este ensayo es de mucha ayuda en el diagnóstico de neumonía por micoplasma; sin embargo no es específico para *M. hyopneumoniae* ya que presenta reacciones cruzadas con otros micoplasmas no patógenos (Thacker E., 2001a).

El uso de Inmunohistoquímica para el estudio de *Mycoplasma hyopneumoniae* es limitado debido a que aún no están disponibles anticuerpos monoclonales específicos contra este microorganismo; sin embargo, se ha detectado el antígeno de *M. hyopneumoniae* en el epitelio de las vías aéreas por inmunohistoquímica usando anticuerpos policlonales (Doster y Lin, 1988).

### **2.8.3.- PRUEBAS SEROLÓGICAS**

La mayoría de laboratorios trabajan con métodos serológicos, ya que estos permiten muestrear gran número de animales (Andrada *et al.*, 2002), detectar exposición de microorganismos en la vida de los animales y poder entender la dinámica de la enfermedad (Calsamiglia *et al.*, 1999).

#### **2.8.3.1 INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN (HI)**

La Inhibición de la hemoaglutinación tiene alta especificidad y sensibilidad, pero su ejecución no es fácil para todos los laboratorios por lo que no se realiza de forma rutinaria. A partir de lavados pulmonares detecta todas las inmunoglobulinas, aunque de forma más marcada en las Ig A; útil en el diagnóstico de infecciones tempranas. Presenta poca correlación con las técnicas de FC y

ELISA (Andrada *et al.*, 2002). Detecta títulos de anticuerpos desde 7 a 8 semanas posteriores a la infección hasta 20 semanas (Sorensen *et al.*, 2002).

#### **2.8.3.2 INMUNOFLUORESCENCIA (IF)**

La Inmunofluorescencia se basa en la utilización de un anticuerpo policlonal o monoclonal conjugado con un fluorocromo sobre cortes de tejido pulmonar en congelación, obtenidos en zonas de pulmón sanas y de zonas con la lesión característica de neumonía micoplásmica (Amanfu *et al.*, 1984; Ross, 1992; Maes *et al.*, 1996; Kobisch y Friis 1996).

Esta técnica es útil en el diagnóstico de la fase aguda de la enfermedad, cuando existen grandes cantidades de micoplasmas en el pulmón; pero la presencia del micoplasma en la lesión no excluye la presencia de otros agentes ni determina el carácter del proceso en cuanto a ser agudo o crónico; además, en procesos crónicos pese a obtenerse las muestras de lesiones neumónicas claras no se puede demostrar su presencia en la lesión, hecho que se explicaría porque el número de micoplasmas desciende, a medida que el proceso se hace crónico (Andrada *et al.*, 2002).

#### **2.8.3.3 INMUNOPEROXIDASA (IP)**

La técnica de la inmunoperóxidasa indirecta fue aplicada por primera vez para el diagnóstico de *M. hyopneumoniae* sobre cortes de tejido pulmonar fijados en formol e incluidos en parafina. La sensibilidad de inmunoperóxidasa sobre cortes en parafina es muy alta, pero plantea la misma problemática que la IFD en casos crónicos (Andrada *et al.*, 2002).

#### **2.8.3.4.- FIJACIÓN DE COMPLEMENTO (FC)**

La Fijación de Complemento es una técnica de alto grado de sensibilidad y especificidad, para grandes volúmenes de muestras al laboratorio, requiere de cierto grado de experiencia, aunque con esta salvedad puede ser una técnica rutinaria asequible (Andrada *et al.*, 2002).

Los anticuerpos frente a *M. hyopneumoniae* se detectan a las dos semanas de la exposición de la bacteria (post infección), pero no se detectan pasados cinco meses post infección (Andrada *et al.*, 2002).

Presenta varias desventajas, la primera es que detecta IgM, cuya vida en el suero es muy corta (Andrada *et al.*, 2002) y por otro lado presenta reacciones cruzadas con *M. hyorhinis* y *M. flocculare* (Freeman *et al.*, 1984).

#### **2.8.3.5.- INMUNO ENSAYO LIGADO A ENZIMAS (ELISA)**

ELISA es considerada como la prueba de mayor utilidad en serología y detecta toda clase de inmunoglobulinas, proporciona medidas cuantificables de los resultados y es considerado muy sensible. Cuando se desarrollo por primera vez, ELISA contenía proteínas antigénicas provenientes del sulfato dodecil sodio solubilizado de células de *M. hyopneumoniae*, las cuales resultaron en reacciones no específicas (Calsamiglia *et al.*, 1999).

Se utilizan dos tipos de ELISA, de bloqueo (detecta anticuerpos por periodos prolongados de tiempo) e indirecto (detecta seroconversión antes) (Halbur, 1997). Esta prueba es la mejor prueba serológica disponible actualmente (Clark, 1999).

#### 2.8.3.6.- **ELISA INDIRECTO**

ELISA indirecto es frecuentemente utilizado en los Estados Unidos. El suero problema es incubado con un antígeno que recubre el fondo de los posillos, así cualquier anticuerpo específico contra *M. hyopneumoniae* se une al antígeno formando un complejo antígeno anticuerpo en la superficie del posillo de la placa.

Después de la incubación y el lavado, se adhiere un conjugado marcado con peroxidasa, el cual se une a los anticuerpos porcinos compuestos con el antígeno del micoplasma. El conjugado no ligado es removido por el lavado y se adhiere al sustrato que contiene un cromógeno, resultando en una reacción de color que puede ser medible. La reacción se expresa como Densidad óptica (DO), o como el radio de cambio de color de la muestra en comparación con el positivo (Halbur, 1997).

La especificidad del ELISA ha sido mejorado por el uso de un detergente Tween 20 para la extracción de las proteínas de membrana de las células completas de *M. hyopneumoniae*, de ese modo se reduce el contenido de pesos moleculares proteicos altos (mayores de 90kD) y bajos (menores de 31kD) (Calsamiglia *et al.*, 1999).

Bereiter *et al.* (1990) compararon el ELISA indirecto con la prueba de FC en un experimento con cerdos de seis semanas de edad que fueron inoculados y seguidos durante un año. Se detectó anticuerpos dos semanas post infección con FC y a las tres semanas post infección con el ELISA indirecto. Los anticuerpos mediante ELISA pueden ser detectados en niveles bajos por año, pero no son detectables por mas de cinco semanas por FC (Halbur, 1997).

Se ha mostrado que las reacciones cruzadas con *Mycoplasma flocculare* y *M. hyorhinis* son mínimas, especialmente en infecciones naturales, pero todavía existen debido a que tienen las proteínas comunes p74, p53 kDa (Mori *et al.*, 1988) o las proteínas p73 y p41 (Boelske *et al.*, 1987). Aún así, los resultados con ELISA Tween 20 deben ser evaluados con precaución sobre todo cuando las densidades están entre 0.200 y 0.260, debido a que esto es observado en infecciones tempranas o tardías y pueden ser sólo reacciones cruzadas con *M. flocculare* (Calsamiglia *et al.*, 1999).

#### 2.8.3.7.- **ELISA DE BLOQUEO**

ELISA de bloqueo es más usado en Europa (Halbur, 1997) ya que minimiza los problemas de reacciones cruzadas con otros micoplasmas (Andrada *et al.*, 2002), basado en la utilización de anticuerpos monoclonales antip40 (Le Potier *et al.*, 1994) o antip70 (Feld *et al.*, 1992).

Gracias al uso de anticuerpos monoclonales es posible un aumento en la especificidad a nivel epitomal, por lo que detecta anticuerpos de infecciones con cepas de campo de *M. hyopneumoniae* y no detecta anticuerpos contra otros micoplasmas no patógenos (Halbur, 1997).

Sorensen *et al.*, en 1992 evaluaron ELISA de bloqueo encontrando una sensibilidad de 93% y una especificidad de 96%.

La detección de anticuerpos es más estable en el tiempo en el ELISA de bloqueo comparado con el ELISA indirecto (Desmettre *et al.*, 1994), pero la seroconversión es detectada antes con el ELISA indirecto, en general existe una interrelación positiva entre las dos pruebas (Halbur, 1997).



Anticuerpos son detectados con ELISA de bloqueo de tres a cuatro semanas post infección y los picos se han observado de diez a doce semanas post infección (Halbur, 1997). Wallgren *et al.* (1996) también comparó el ELISA indirecto con el ELISA de bloqueo y encontró que con el ELISA indirecto los cerdos seroconvertían el día 20 versus el día 40 con el ELISA de bloqueo.

#### 2.8.4.- **EVALUACIÓN DE RASTRO**

Para evaluar la prevalencia de lesiones de MH en la granja, se recomienda revisar los pulmones de los cerdos en el camal, pero se debe tomar en cuenta que, la prevalencia está en relación directa a la incidencia, el tiempo en que apareció la enfermedad y a la tasa de resolución de las lesiones. Si la infección ocurrió temprano, se resuelven las lesiones pulmonares y en el rastro se subestima la prevalencia, sin embargo, se observa la pérdida de peso en los animales. Si la infección ocurrió tardíamente en el engorde, en el rastro se observa un gran número de pulmones con lesiones, pero el peso de los animales generalmente no se afecta (Noyes *et al.*, 1988 y Scheidt *et al.*, 1990).

Estudios de Scheidt *et al.* (1990) reportan que por cada 10% de pulmón neumónico se disminuye en 37.3 gramos la ganancia diaria de peso.

La observación de las lesiones en el camal ha demostrado ser un pobre indicador del tiempo de vida de la neumonía en cerdos, debido a que dichas lesiones progresan y regresionan durante el tiempo de vida del animal (Noyes, 1990). Es por esto, que dicha observación por si sola es insuficiente para demostrar el efecto de la infección con *M. hyopneumoniae* durante el periodo de engorde.

## 2.8.5 PRUEBAS DE LABORATORIO PARA LA DETECCIÓN DE ADN

### 2.8.5.1 HIBRIDACIÓN IN SITU

Esta prueba puede identificar las células hospederas que están siendo infectadas por *M. hyopneumoniae* con gran especificidad y sensibilidad. Esta prueba es capaz de detectar pequeñas cantidades de ADN (Kwon, 1999).

Un estudio realizado por Kwon (1999) demostró que 55% de animales naturalmente infectados con este agente fueron positivos a la hibridación **In Situ** en el epitelio de bronquios y bronquiolos, la mayoría de animales eran menores de los 50 días de edad. Mientras un 25% de animales fueron positivos en los neumocitos de tipo I.

Estas observaciones sugieren que ocurren cambios en la localización del *M. hyopneumoniae* ocurren durante el curso de la infección. Aunque esto se puede deber también a la infección con diferentes cepas de este agente (Kwon, 2002).

### 2.8.5.2- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Una alternativa de diagnóstico es el PCR, el cual posee una alta sensibilidad y especificidad además de ser una técnica rápida (Bej *et al.*, 1991). Con PCR se puede tener el diagnóstico en un período de solo 2 días, esta prueba se usó desde inicios de los años 90 (Harasawa *et al.*, 1991), pero no fue evaluado bajo condiciones de campo.

Esta técnica está basada en el análisis de secuencia de ADN mediante la utilización de primers (iniciadores) (Andrada *et al.*, 2002). Los primers han sido probados con muchos Micoplasmas y Acholeplasmas descritos en cerdos (*Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma flocculare*, *Mycoplasma hyosynoviae*, *Mycoplasma*

*hyopharyngis*, *Mycoplasma búchale*, *Actinobacillus axanthum*, *Actinobacillus granularum* y *Actinobacillus laidlawii*) así como algunos micoplasmas aviares. Los primers para PCR de *M. hyopneumoniae* no han sido amplificados del DNA de ningún microorganismo (Calsamiglia *et al.*, 1999).

Los primers han sido probados en animales vivos, en estudios usando animales libres de patógenos y desafiándolos con *M. hyopneumoniae*. Después del desafío todos los animales fueron hisopados y mostraron ser negativos por PCR. Sin embargo, PCR es una prometedora herramienta para determinar los perfiles de las piaras, portadores y estado de salud de diferentes granjas con presión de la enfermedad (Calsamiglia *et al.*, 1999).

Numerosos ensayos con PCR han sido desarrollados con el fin de detectar al *M. hyopneumoniae* (Verdin *et al.*, 2000). PCR puede ser extremadamente sensible en la recolección de DNA de pocos organismos, en la mayoría de los casos la mejor muestra proviene de lavados bronquiales. La presencia de *M. hyopneumoniae* en el tracto respiratorio alto y bajo es transitorio. Se ha detectado organismos en hisopado nasal en un 33%, hisopado traqueal en 83% y 100% en lavado bronquio alveolar (Thacker E., 2001a).

PCR anidado y “Nested” PCR fueron desarrollados para la detección en explotaciones de cerdos e identificación de cepas de *M. hyopneumoniae*, utilizando como muestras, torundas nasales, fluidos bronquio-alveolares, lavados traqueo -bronquiales y muestras de aire. Las muestras obtenidas de torundas traqueo -bronquiales y de lavados bronquio -alveolares resultaron mejores indicadores de la infección que las muestras obtenidas de las torundas nasales o tejido pulmonar (Andrada *et al.*, 2002). Sin embargo, estudios previos han detectado que el PCR anidado no detecta *Mycoplasma* de hisopados nasales (Calsamiglia *et al.*, 1999).

El “Nested” PCR resultó ser más sensible en comparación con el PCR anidado, el “Nested” PCR demostró ser valioso para el diagnóstico de infecciones de *M. hyopneumoniae* cuando no se observan lesiones típicas de la neumonía micoplasmal en pulmones o cuando los cultivos resultaron negativos; pero hay que tener en cuenta que también se han observado falsos positivos (Andrada *et al.*, 2002).

En los últimos años se han probado diferentes técnicas de PCR para detectar *M. hyopneumoniae*, es así que se desarrollaron técnicas basadas en detectar la p36 y otra donde se detectaba la p46 y una técnica múltiple donde analizaban la p36 y p46 de manera conjunta. La técnica de PCR-p36 parece ser más sensible ya que detecta el 93.3% de casos positivos en lavados tráqueobronquiales y 100% de positivos en tejidos pulmonares. Mientras que las PCR-p46 y la PCR-p36-p46 tuvieron una sensibilidad de 86.6% (Caron *et al.*, 2000a).

#### 2.8.6.- **DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL**

Es importante establecer un diagnóstico diferencial, fundamentalmente porque *M. hyopneumoniae* interacciona con los otros patógenos respiratorios del cerdo y es necesario conocer qué organismos están implicados en las lesiones neumónicas que se observan; además, la presencia de *M. hyopneumoniae* en pulmón o vías respiratorias no implica necesariamente que se desarrolle la enfermedad; entre los patógenos más comunes se encuentran el virus de la Influenza porcina, el virus del PRRS, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuroneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica* y *Streptococcus sp.*

## 2.9.- **TRATAMIENTO**

El tratamiento con antibiótico no cura completamente las lesiones pulmonares, sólo reduce las manifestaciones clínicas de la neumonía enzoótica. Los antibióticos más usados son tetraciclinas, tilosina, tiamulina, lincomicina, entre otros (Camacho *et al.*, 2003).

Las tetraciclinas no previenen el establecimiento de la infección y las lesiones desarrollan después de suspender la medicación. La administración repetida de oxitetraciclina de acción prolongada durante la lactancia y los periodos iniciales de transición puede tener potencial para la reducción de neumonías que ocurren en las fases tardías (Ross, 2000). La clortetraciclina tiene buena acción preventiva pero su efectividad disminuye cuando se administra 10 a 24 días post infección (Desrosiers, 2001).

La combinación de tiamulina con clortetraciclina u oxitetraciclina puede ser beneficiosa para reducir la gravedad de la enfermedad. Un nuevo derivado de pleuromutilina tiene probabilidades de ser más eficaz que la tiamulina contra *M. hyopneumoniae* (Ross, 2000).

Los antibióticos de las familias de las quinolonas (enrofloxacin, danofloxacin, norfloxacin y ofloxacin) tiene buena actividad contra este agente in vitro (Ross, 2000). Las fluoroquinolonas son útiles pero su uso es limitado para evitar resistencia en humanos (Desrosiers, 2001).

Wallgen (1993) reportó buenos resultados usando tiamulina (22 mg por kilo de peso vivo) junto con el alimento por 7 días a la semana 2, 4, 7, 10 y 13, de la etapa de engorde.

Amoxicilinas, penicilinas, estreptomicinas y eritromicinas no tiene valor en el tratamiento. La resistencia del micoplasma a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, que interfieren con la formación de pared celular de las bacterias, es explicada por la ausencia de pared celular (Anónimo, 2002).

## **2.10.- CONTROL Y PREVENCIÓN**

### **2.10.1.- CONTROL POR ERRADICACIÓN**

Un objetivo de estrategias de control es reducir la severidad del complejo respiratorio porcino sobre todo en las etapas de crecimiento y acabado (Bosch, 2000).

La erradicación de *M. hyopneumoniae* se ha iniciado en varios países, como Dinamarca, Reino Unido y Suiza que tienen unidades de cerdos libres del microorganismo (Andrada *et al.*, 2002).

Existen tres sistemas principales para la eliminación y/o erradicación de la NMC (Baekbo, 1999):

1. Eliminar a todos los animales para después repoblar la granja con cerdos no infectados.
2. Realización de pruebas y eliminación de todos los animales
3. Erradicación sin despoblación y repoblación total, incluyendo cambios temporales en el flujo de producción, lo cual se puede combinar con la administración de antibióticos.

El método 1 se puede utilizar en piaras de finalización; así como en las granjas de ciclo completo, los métodos 2 y 3 son relevantes sólo en granjas de ciclo completo o en las productoras de lechones para engorde. Un prerequisite para el método 1, es la disponibilidad de animales procedentes de una fuente no infectada (Baekbo, 1999).

El principal problema de los esquemas de erradicación es que las infecciones por *M. hyopneumoniae* pueden volver a establecerse por sí mismas en granjas libres de neumonía enzoótica vía diseminación en aerosol (Andrada *et al.*, 2002)

Existen otros métodos usados para erradicar este agente en granjas ya establecidas son:

- Histerectomía y aislamiento: Obtención de lechones por histerectomía y se crían separados de la madre, aislados en otro lugar distinto. El lugar aislado destinado para la cría de los lechones deberá estar al menos separado 3 Km. el lugar infectado más cercano. Es un método complicado para granjas de gran tamaño. Se ha utilizado a menudo para establecer núcleos genéticos de tamaño pequeño (Andrada *et al.*, 2002).
- Otros investigadores proponen un sistema de saneamiento parcial, alternativo a la repoblación con animales SPF y mucho más económico. Este sistema consiste en quitar de la granja todos los cerdos jóvenes y las cerdas de reposición, aplicando un tratamiento antibiótico de dos semanas de duración en las restantes madres más viejas para eliminar *M. hyopneumoniae*; después debe establecerse un programa de vigilancia para asegurar que no existe reentrada de la enfermedad. Otros investigadores han demostrado la utilidad de un sistema similar al anterior en granjas núcleo de producción o de ciclo cerrado. El sistema consiste en detener los partos durante 2 semanas, eliminar los lechones destetados, cerdos en crecimiento y de engorde, manteniendo en la granja solamente las hembras y machos de producción de más de 10 meses de edad, a los que se les administra durante ese tiempo un tratamiento antibiótico. Las instalaciones son limpiadas y desinfectadas; transcurridos los 14 días se continúa con la dinámica normal de partos de la

granja. Posteriormente se establece un programa de vigilancia, con métodos serológicos y de PCR (Andrada *et al.*, 2002).

#### **2.10.2.- CONTROL POR MEDIDAS DE MANEJO Y BIOSEGURIDAD**

Con el objetivo de disminuir las enfermedades respiratorias se han desarrollado diferentes estrategias como: destete precoz segregado, sitios múltiples de producción, destete temprano (Thacker E., 1999b), destete precoz medicado (Ciprian, 2001), entre otros.

Uno de los mejores métodos para reducir el número de animales con signos clínicos y prevalencia de micoplasma, es evitar el mezclado de diferentes edades, y mantener grupos pequeños de cerdos (20 o menos) con espacio suficiente. Aunque esto no elimina al MH reduce considerablemente la infección y las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Feelstrom, 1992).

Mediante el sistema de Destete Precoz Segregado (DPS), los lechones son destetados entre los 14 y 17 días de edad (Thacker E, 1999a) y si el sistema es bien llevado, los lechones provenientes de madres vacunadas se convierten en seronegativas a las 6 semanas de edad (Kirk, 1999).

Los sistemas tradicionales de producción son; “producción en un solo sitio” o ciclo cerrado y “producción en dos sitios” o ciclo abierto. La introducción del sistema “producción en tres sitios o múltiples fases” aporta una serie de ventajas sobre los métodos tradicionales ya que diferencia a las reproductoras (1 sitio de gestación / partos), recría (1 de destete hasta 25 Kg), Engorde o acabado (1 sitio de 25 Kg. hasta el sacrificio) y se produce la eliminación de agentes infecciosos sin la necesidad de una despoblación total (Andrada *et al.*, 2002).



La medicación por pulsos consiste en administrar un número limitado de medicaciones en forma de pulso a dosis terapéuticas, intercaladas con períodos de descanso. El número de pulsos puede variar de una granja a otra, pero se fundamenta en favorecer una mayor exposición a los patógenos endémicos actuando sobre el periodo de incubación, previniendo así la fase de enfermedad clínica. El tratamiento vía agua facilita la administración de los pulsos (Suárez y Casas, 2001). El fármaco debe estar presente en el momento de exposición al agente, ser efectivo y se debe obtener concentraciones elevadas en el fluido de revestimiento epitelial que cubre los cilios (Suárez y Casas, 2001).

Las observaciones de Holmgren *et al.* (1994). Compararon el número de animales que seroconvertían en un sistema de producción por grupos de “todo dentro todo fuera” y uno continuo, encontraron que los cerdos mantenidos en sistema continuo tuvieron mayor grado de infección a *M. hyopneumoniae* en comparación de los del sistema “todo dentro todo fuera”, debido a que el último redujo considerablemente el grado de contaminación de los cerdos.

El destete precoz aislado y producción en múltiples fases está basado en separar y especializar las fases de la producción, interrumpiendo el ciclo de los patógenos y disminuir la contaminación, obteniéndose animales libres de enfermedad (Andrada *et al.*, 2002).

El tratamiento con antibióticos ha tenido éxitos variables, ya que no previene el establecimiento de la infección, sólo previene la enfermedad clínica y el cese de la medicación lleva a nuevas infecciones. Los medicamentos más utilizados son tetraciclina, tilosina, lincomicina, tiamulina, espiramicina y quinolonas (enrofloxacina, danofloxacina y norfloxacina) (Andrada *et al.*, 2002).

### 2.10.3.- **VACUNACIÓN**

En el mercado existen diversas vacunas comerciales contra *M. hyopneumoniae*. Todas son inactivadas y la mayoría son de aplicación parenteral y se componen de organismos completos o extractos de ellos, combinados con hidróxido de aluminio. También se ha ensayado el uso de vacunas lapinizadas, aplicadas en aerosol, orales, intraperitoneales y adyuvantadas en diluyente oleoso (Andrada *et al.*, 2002).

La vacunación es el método de prevención más importante, por ello se deben utilizar bacterinas que contengan un adyuvante adecuado a fin de estimular una sólida inmunidad celular y humoral (Camacho y Calle, 2003). Recientes estudios se han centrado en entender el efecto de los adyuvantes en varios aspectos de la respuesta inmune. Se conoce el efecto de los adyuvantes de aumentar la inmunogenicidad de los antígenos vacunales e inducir la maduración de anticuerpos (Djordjevic *et al.*, 1997).

Estudios recientes indican que el uso de vacunas comerciales contra *M. hyopneumoniae* confiere protección contra la enfermedad; sin embargo, no eliminan completamente la neumonía o la colonización del micoplasma. Las razones se desconocen, pero se atribuye a que se desconoce exactamente su patogenia (Chang, 2001).

Estudios clínicos con vacunas modernas contra *M. hyopneumoniae* confirmaron que el control de este agente es beneficioso y mejora la ganancia diaria de peso (Baekbo, 2000).

En pruebas controladas todas las vacunas comerciales han demostrado que reducen el número y la extensión de las lesiones en un 50% o más y mejoran la ganancia diaria de peso y el índice de

conversión. También han demostrado reducir los tratamientos antibióticos (Andrada *et al.*, 2002).

La vacunación contra *M. hyopneumoniae* reduce la severidad de lesiones pulmonares hasta en un 50% (Truchan *et al.*, 2000) y limita el número de infecciones secundarias (Maes *et al.*, 2000). Así mismo, mejora la eficiencia alimenticia y la ganancia de peso diario en la fase de acabado (Diekman *et al.*, 1999).

La vacunación induce tanto respuesta celular como humoral (Thacker *et al.*, 1998). Existen adyuvantes acuosos y oleosos en las bacterinas contra *M. hyopneumoniae*, se ha comprobado que los adyuvantes oleosos estimulan altos títulos de respuesta humoral (Millar, 2000).

En la mayoría de las granjas porcinas del Perú no vacunaban contra *M. hyopneumoniae*, principalmente por que la vacuna ha sido promocionada recién en los últimos 8 años ; Sin embargo, en un estudio realizado en Lima se encontró, que se obtiene un beneficio económico de \$ 3.00 por porcino (Valdivia, 1999). Dayalú (1990) señaló que animales no vacunados demoran 13 días más para llegar al mercado encareciendo el producto en \$7.02 por cerdo.

Otra ventaja de la vacunación contra este agente es que ésta, disminuye la potenciación de la neumonía causada por PRRS en cerdos desafiados con ambos agentes (E. Thacker *et al.*, 1999a).

En el mercado existen vacunas contra *M. hyopneumoniae*, y en su mayoría son vacunas de dos dosis, sin embargo, recientemente se han desarrollado vacunas de una dosis, las que ofrecen protección al igual que las vacunas de dos dosis. Es así como, la vacunación de los porcinos durante la etapa de crecimiento

produce una respuesta sólida, especialmente con las vacunas de dos dosis, aunque la vacunación a una dosis produce títulos de anticuerpos similares a las de dos dosis, pero la seroconversión es más tardía (Pijoan, 2002).

Existen vacunas autógenas, las que están hechas a base de microorganismos extraídos de pulmones neumónicos de un hato en particular, para luego elaborar una autovacuna. La eficacia y necesidad de vacunas autógenas es aun cuestionable, ya que, no siempre se puede asegurar que el cultivo obtenido para elaborar la vacuna sea puro, es decir, sin estar contaminado con *M. hyorinis* que es lo que comúnmente sucede, es así que la presencia de *M. hyorinis* en la vacuna puede hacernos dudar de la real masa antigénica de *M. hyopneumoniae* en la misma (Thacker E., 2000).

Se ha ensayado el uso de vacunas vivas lapinizadas, aplicadas en aerosol, orales intraperitoneales y adyuvantadas en diluyente oleoso (Andrada *et al.*, 2002). Además, el desarrollo de vacunas ADN parece ser promisorio como método de control de *M. hyopneumoniae*, ya que ésta estimula ambas respuestas humoral y celular, sugiriéndose que sea hecha a base de la proteína P42 (Chen *et al.*, 2003). El antígeno recombinante Mhp 1 (una proteína de *M. hyopneumoniae*), se ha diseñado como vacuna potencial, pero sólo proporciona una mínima protección (King *et al.*, 1996).

#### 2.10.3.1.- **VACUNACIÓN DE MARRANAS**

La inmunización de las marranas gestantes se ha propuesto como método para proteger a los animales en la etapa de lactancia. Kobisch *et al.* (1994), inmunizaron marranas a las ocho y tres semanas antes del parto; los lechones fueron desafiados con Mh del tercero al séptimo día de edad; una parte de los lechones nuevamente fueron desafiados a *Pasteurella multocida* (Pm) a los

28 días y terminaron las observaciones a los 42 días de edad. Determinaron los signos clínicos (cuenta diaria de tos por 10 minutos en tres semanas), temperatura rectal, peso, cerdos con neumonía y aislamiento de Mh y Pm. La conclusión fue que la vacunación de las hembras protegió a los lechones contra Mh y en forma indirecta contra Pm, al evitar que se exacerbara la enfermedad.

La vacunación de la hembra, reduce la prevalencia de lechones colonizados por micoplasma al destete; lo cual puede ser usado como método de control de la enfermedad en sistemas estrictos de todo dentro todo fuera (Pijoan, 2002) Produciendo una mayor seroconversión de las marranas y una eficiente transferencia de anticuerpos calostrales a sus lechones, la cual puede detectarse a las 7 semanas de edad (Pijoan, 2002).

La aplicación de vacunas múltiples simultáneas, contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en marranas, no les ocasiona efectos adversos, ni influye negativamente en sus niveles de anticuerpos séricos al momento del parto, ni en los niveles séricos de anticuerpos de sus crías a las 3 semanas de edad (Kristensen, 2004).

En 1998, una empresa canadiense que seguía un programa de vacunación de lechones, tuvo un brote de neumonía enzoótica en destete y engorde, es así que decide vacunar a las madres al termino de la gestación teniendo como resultado un control total del brote (Surprenant, 2001).

En granjas con sitios separados, la vacunación en madres puede disminuir la prevalencia de infectados al destete a niveles tan

bajos, que el grupo no desarrolle el problema clínico antes de ir al camal. En granjas de un sitio, la presión de infección de orígenes ajenos al grupo de destete es muy grande y estos animales presentarán la infección en forma tardía. Por esta razón, en esas granjas es conveniente vacunar a la línea de producción y no a las madres. (Pijoan, 1999).

#### **2.10.3.2.- VACUNACIÓN DE LECHONES**

En varios experimentos se ha demostrado que los anticuerpos maternos interfieren en la vacunación motivo por el cual se debe evaluar el momento de declive de los anticuerpos calostrales para no interferir con la vacunación (Thacker *et al.*, 2001b).

Existe controversia sobre la edad en la cual los lechones se deben vacunar, lo ideal sería hacerlo antes del momento de la infección y previamente a la desaparición de la inmunidad proporcionada por el calostro (Calle, 2003). Con frecuencia se utiliza la serología para monitorear los niveles de anticuerpos maternos, debiéndose tomar en cuenta que los porcinos no tienen que ser completamente seronegativos para que la vacunación sea efectiva y que los anticuerpos provenientes de la inmunidad natural no aparecen hasta las 4 ó 6 semanas después de la exposición al patógeno (Kuhn, 2003).

La eficacia de la vacunación resultará reducida por los anticuerpos maternos si ésta, se realiza entre las 2 y 4 semanas de edad, o cuando hay niveles elevados de anticuerpos (B. Thacker *et al.*, 1998); en cambio, si se realiza entre las 4 y 6 semanas de edad no interferirá con la respuesta inmune inducida por la vacunación (E. Thacker, 2001). Acorde con lo indicado por otros investigadores, donde la vacunación realizada unas

semanas más tarde puede mejorar la eficacia de la vacuna, posiblemente debido a un menor impacto de los anticuerpos maternos en los lechones. La influencia de los anticuerpos maternos puede variar entre las distintas granjas (Jensen *et al.*, 2000; Pommier *et al.*, 2000; Thacker *et al.*, 2000).

La vacunación entre 9–10 semanas de edad o al final de la etapa de cría, puede disminuir el nivel de anticuerpos vacunales y maximizar el efecto de la vacuna (Yeske, 2001).

En un estudio realizado en una granja porcina tecnificada del departamento de Lima, encontró que los anticuerpos transmitidos por las madres no vacunadas y expuestas naturalmente descienden con mayor rapidez, que los transmitidos por las madres vacunadas, quedando expuestas las crías a infecciones naturales. Además, el sexo no ejerce ningún efecto sobre la persistencia de anticuerpos, más si, la condición inmunológica de la madre (Calle *et al.*, 2003)

La inmunización a una dosis reduce en un 88% las lesiones pulmonares (Burch, 2003b) e incrementa 13 gr./día (Congress reports gain from Mycoplasma vaccination, 2000).

Los anticuerpos maternos son menores, si los porcinos provienen de una sola fuente en la que practican todo dentro todo fuera donde el riesgo de infección es menor, o cuando la crianza se da a fines de invierno, primavera o principios de verano (Burch, 2003a).

Actualmente se han desarrollado vacunas de una dosis, que intentan emular el efecto booster de las vacunas de dos dosis, mediante el uso de un adyuvante fuerte. Yeske (2001) en EE.UU. recomiendan reservar las vacunas de una dosis para

granjas donde se practique el sistema todo dentro todo fuera, que tengan baja presentación de casos de PRRS y además que ésta se aplique al final del periodo de destete cuando los cerdos tienen entre 9 a 10 semanas de vida para obtener un impacto mínimo sobre los anticuerpos maternos y maximizar la respuesta a la vacuna.

Existen vacunas de una dosis que inducen una respuesta inmune efectiva que dura hasta 25 semanas postvacunación, reduciendo el manejo y el estrés sobre el animal que implican los productos de dos dosis (Kuhn, 2000b). Por otro lado, se ha comprobado que la inmunización a las 8 semanas de edad alcanza una inmunidad óptima a las 12 semanas (Kuhn, 2000a).

Existen bacterinas comerciales de dosis única y con mayor concentración antigénica, que ofrece una respuesta serológica efectiva contra el micoplasma, al estimular los Th1 de la respuesta celular inmune, además, conduce a una respuesta inmune humoral/local en las mucosas, elevando los niveles de IgG e IgA en los fluidos bronquioalveolares (Casique, 2002; Kuhn, 2000b).

Estas bacterinas monodosis están hechas a base de un cultivo de *M. hyopneumoniae* inactivada químicamente, lo que hace que sea incapaz de causar la enfermedad respiratoria, pero, efectiva en estimular la respuesta inmunológica. Además, contiene un adyuvante de aceite en agua, hecho a base de micelios, cubiertos por lecitina, permitiendo que más antígenos se adhieran, que con los tradicionales adyuvantes a base de aceite; este adyuvante realza y prolonga aún más la respuesta inmunológica, ayudando a la vacuna a activar las células macrófagos del sistema inmunológico y estimular una respuesta inmunológica más completa y prolongada (Kuhn, 2000b).



La vacunación con dos dosis se recomienda cuando existe presión de infección por otros patógenos, y en granjas de Flujo continuo o granjas que no puedan llevar un sistema estricto de Todo dentro Todo fuera (Yeske, 2001).

La inmunización de dos dosis reduce las lesiones pulmonares en un 82 a 91% (Anónimo, 2003), mejora la ganancia de peso diario en 21-59 gr./cerdo y el índice de conversión 0.02 a 0.05 Kg. (Muñoz, 1996), además los animales salen al mercado de 4 a 11 días antes (Deyalu, 1992).

No existen diferencias estadísticas significativas en la habilidad de reducir lesiones pulmonares inducidas por desafíos experimentales entre vacunas comerciales de dos dosis. Una de las principales diferencias entre vacunas comerciales contra micoplasma es el porcentaje de cerdos vacunados que experimentan la seroconversión luego de la vacunación. La variabilidad en la seroconversión, puede deberse a las diferencias en los adyuvantes o proteínas inmunogénicas presentes en las vacunas (Thacker E., 1999b).

Lium *et al.* (1994) estudiaron dos vacunas comerciales (Suvaxyn M. hyo de Solvay Animal Health y Stellamune Mycoplasma de Smith kline Beecham Animal Health) dando como resultado, que las dos vacunas redujeron el grado de lesiones pulmonares y la prevalencia de cerdos con bronconeumonía al rastro, aunque no afectó la ganancia de peso con relación al control.

En 1999 Valdivia *et al.*, encontraron que animales inmunizados contra *M. hyopneumoniae* obtenían mejor rendimiento en peso comparado con animales no vacunados durante el período experimental. Calle, 2003 observó que en lechones provenientes de

madres no vacunadas el nivel de anticuerpos descendía con mayor rapidez que en madres vacunadas, concluyéndose que es necesario conferir inmunidad a los animales en la etapa de recría.

La vacunación frente a *Mycoplasma hyopneumoniae* puede reducir e incluso evitar, en algunos casos, las lesiones pulmonares, mejorando el índice de conversión y la ganancia media diaria en los animales vacunados Valdivia *et al* (1999) reduciendo asimismo el gasto con antimicrobianos (Tajima M. 1984).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. LUGAR DE ESTUDIO**

El estudio se realizó en el valle del Río Chillón, provincia de Lima, departamento de Lima; camal José Olaya y el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

#### **3.2. ANIMALES Y TAMAÑO MUESTRAL**

Para determinar el tamaño muestral se utilizó la fórmula de Diferencias de Medias:

$$n = \left( \frac{(Z(a) + Z(b)) \cdot SD}{m1 - m2} \right)^2$$

Donde:

Z(a)= valor tabular al 95% de confianza especificado. (1.96)

Z(b)= valor para el 90 % la potencia de la prueba especificada. (1.282)

SD = desviación Estándar esperada expresado en kilos (2)\*

m1= media esperada de pesos en lechones al final de los 145 días de edad en el mejor grupo de tratamiento (84 Kilos)\*

m2 = media esperada de pesos en la población de lechones al final de los 145 días de edad en el grupo control (81 kilos)\*

\*Valdivia y Calle, 1999.

El tamaño de muestra calculado fue de 12 animales mínimo por cada grupo en estudio. Sin embargo, en el trabajo se utilizaron grupos de 30 animales.

### **3.3. SISTEMA DE MANEJO DE LOS PORCINOS EN LA GRANJA**

La granja es positiva a *M. hyopneumoniae*, demostrado en un estudio anterior en donde se encontró que el 66.6% de los animales presentaron anticuerpos contra esta bacteria (Torres et al., 2006); donde no se practica la vacunación contra este microorganismo, no se emplea alimento medicado como medida de control y se maneja un sistema de todo dentro todo fuera en una producción en un solo sitio.

La granja cuenta con un plantel reproductor de 600 madres, el destete se practica a los  $19 \pm 2$  días, luego pasan al área de recría donde permanecen hasta los 70 días de edad, al término pasan al área de engorde hasta llegar a los 145 días o peso de beneficio (90 Kg. de peso vivo).

El programa de vacunación incluye Rinitis atrófica (7 y 21 días de edad), Erisipela porcina (36 días de edad) y Cólera porcino (45 días de edad).

Los 240 animales seleccionados para el estudio, fueron divididos en 2 ensayos de 120 animales cada uno, dividido en 4 tratamientos, fueron identificados con tatuaje en la oreja con un número de cuatro dígitos. La primera letra indicaba el grupo, el segundo número indicaba el sexo (solamente como referencia, y para determinar proporciones iguales de ambos géneros), el tercer y cuarto número indicaba el orden dentro del grupo. Las prácticas de manejo y el programa sanitario fue el mismo que se emplea de manera rutinaria en la granja.

### 3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

La investigación corresponde a dos estudios experimentales de 120 animales cada uno, con 4 diseños completamente aleatorizados, compuesto de 30 animales cada grupo. Ambos estudios son evaluados los resultados en los lechones, con la diferencia que en el segundo estudio, los lechones procedían de 12 madres multíparas (segundo a cuarto parto) vacunadas contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, a las 5 y 3 semanas antes del parto con dos dosis de 2 ml cada una.

Los grupos como se mencionó estuvieron conformados cada uno por 30 animales. El diseño de tratamientos fue según las siguientes tablas:

<b>Cuadro No. 1.- PORCINOS PROCEDENTES DE MADRES SIN ANTECEDENTES DE VACUNACIÓN CONTRA <i>M. hyopneumoniae</i>.</b>			
<b>Tratamiento</b>	<b>Numero de animales</b>	<b>Tipo de vacunación</b>	<b>Programa de Vacunación</b>
<b>1</b>	30	Placebo	Control no vacunado
<b>2</b>	30	2 dosis	35 y 56 días de edad
<b>3</b>	30	2 dosis	42 y 56 días de edad
<b>4</b>	30	1 dosis	42 días de edad

<b>Cuadro N° 2.- EN PORCINOS PROCEDENTES DE MADRES CON ANTECEDENTES DE VACUNACIÓN CONTRA <i>M. hyopneumoniae</i>.</b>			
<b>Tratamiento</b>	<b>Numero de animales</b>	<b>Tipo de vacunación</b>	<b>Programa de Vacunación</b>
<b>1</b>	30	Placebo	Control no vacunado
<b>2</b>	30	2 dosis	35 y 56 días de edad
<b>3</b>	30	2 dosis	42 y 56 días de edad
<b>4</b>	30	1 dosis	42 días de edad

### **3.5. BIOLÓGICOS UTILIZADOS**

Para ambos estudios se utilizaron dos tipos de vacunas contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. Basados en células enteras muertas del microorganismo y acompañadas de un adyuvante oleoso compuesto de 4.5% aceite mineral y lecitina mezclado con agua. Este es un adyuvante oleoso compuesto por 4.5% aceite mineral y lecitina mezclado con agua a diferencia de otros adyuvantes que contienen 10 a 20% de aceite, esta menor proporción de aceite lo hace menos reactivo en el tejido. La lecitina es un emulsificante natural con fosfolípidos y glicolípidos similares en su composición a las membranas celulares de los tejidos proveyendo una cobertura alrededor de las gotitas de aceite. Este tipo de adyuvante tiene la propiedad de causar mínima o nula irritación en el punto de aplicación de la vacuna. El efecto es aumentar los antígenos vacunales e inducir la maduración de anticuerpos.

La diferencia entre ambas vacunas es la composición antigénica, en el caso de una dosis su concentración es de  $\geq 7.5 \times 10^8$  CCU pre inactivadas, mientras que la de dos dosis la concentración es de  $\geq 5 \times 10^8$  CCU utilizada en programas convencionales. En el caso de las madres que fueron vacunadas se utilizó el biológico de doble dosis.

### **3.6.- MATERIALES USADOS EN EL MUESTREO**

Se emplearon Tubos Vacutainer, Aguja para Vacutainer (1' x 22 y 1' ½ x 20), Soporte (Holder), Algodón, Tintura de Yodo, Balanza, Fichas diarias, Tatuador, Tinta china, Jeringas.

### **3.7.- MATERIALES Y EQUIPOS USADOS EN EL LABORATORIO**

Centrifuga, Congeladora, Espectrofotómetro, Viales de 2ml, Erlenmeyer, Pipetas simples y multicanales, Tips, Kit de ELISA (Herd Check\*M hyo) y agua destilada.

### **3.8.- MÉTODO DE COLECCIÓN DE LA MUESTRA**

Las muestras de sangre se extrajeron por punción de la vena cava y con tubos al vacío. Las muestras se colectaron en los días 21, 42, 70, 84, 112 y 145 respectivamente.

Las muestras fueron rotuladas con la edad y el número de tatuaje del animal a la que pertenecía, las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM para la extracción del suero. Estos fueron almacenados en viales a temperatura de congelación hasta su procesamiento mediante la prueba serológica.

Los animales fueron pesados al destete (19 días de edad) y al ser llevados a camal (145 días de edad) para determinar la ganancia de peso de los animales.

Para la evaluación de consolidación pulmonar, se examinaron los pulmones en el camal de acuerdo a lo estipulado por Piffer y Britto (1991).

### **3.9. MÉTODO DE DETECCIÓN DE ANTICUERPOS**

Para la detección y determinación de la concentración de anticuerpos contra *M. hyopneumoniae*, se utilizó el kit comercial ELISA indirecto Herd Check\*<sup>M</sup> hyo. La reacción es expresada como Densidad óptica (DO). Esta prueba es considerada como la de mayor utilidad en serología y puede detectar la seroconversión temprana de toda clase de inmunoglobulinas, proporcionando medidas cuantificables de los resultados y es considerado muy sensible.

A continuación se detallan los pasos a seguir en el desarrollo del protocolo de la prueba diagnóstica.

### 3.9.1.- PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras fueron diluidas en solución tamponada a base de azida de sodio, en razón de 1:40 antes de empezar el análisis.

### 3.9.2.- PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE LAVADO

Se dejó que la solución tamponada de fosfato con gentamicina 10X a una temperatura de 20-27°C y se mezcló para la disolución de sales precipitadas. La solución de lavado se diluyó en proporción de 1:10 con agua destilada antes de ser empleada.

### 3.9.3.- PROCEDIMIENTO DEL ANÁLISIS

Se dejó temperar los reactivos y agitó suavemente con movimientos circulares.

- Se cogió las placas tapizadas con antígenos y se anotó las posiciones de las muestras en el cuaderno de trabajo.
- Se añadió 100 µl de control negativo, que viene incluido en el kit comercial, en los posillos A1 y B1.
- Se añadió 100 µl de control positivo, también incluido en el kit comercial, en los posillos C1 y D1.
- Se añadió 100 µl de muestra diluida en los posillos correspondientes.
- Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se aspiró el contenido del líquido de todos los posillos y se eliminó en un recipiente con desinfectante.
- Se lavó cada posillo de tres a cinco veces con unos 350 µl de solución de lavado y se aspiró completamente.
- Se añadió 100 µl de conjugado anti- porcino: peroxidasa de rábano a cada posillo.
- Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se aspiró el contenido del líquido de todos los posillos y se



elimino en un recipiente con desinfectante.

- Se lavó cada posillo de tres a cinco veces con unos 350 µl de solución de lavado y aspiró completamente.
- Se añadió 100 µl de la solución de sustrato buferada en cada posillo.
- Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se añadió 100 µl de la solución de Interrupción en cada posillo.
- Se calibró el lector de ELISA en blanco con aire y
- Finalmente se midió la concentración de anticuerpos en el espectrofotómetro con los valores de absorbancia a 650 nm y el registro imprimió para su análisis.

#### 3.9.4.- LECTURA E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Para que el ensayo sea válido, la diferencia entre el promedio del control positivo y del control negativo debe ser mayor o igual de 0.150. La absorbancia del promedio del control negativo debe ser menor o igual de 0.150. La presencia o ausencia de anticuerpos frente a *M. hyopneumoniae* se determina por medio de una relación entre el valor de absorbancia de la muestra con el promedio del control positivo.

El control positivo está normalizado y representa concentraciones significativas de anticuerpos frente a *M. hyopneumoniae* en el suero y plasma porcino. La concentración relativa de anticuerpos en la muestra se determina a través del cálculo del coeficiente de la absorbancia de la muestra con respecto a la del control positivo (M/P). Los títulos finales se calculan a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Log}_{10} \text{ del título} = 1.09 (\log_{10} M/P) + 3.36$$

Para determinar la positividad o negatividad de las muestras se consideraron los siguientes criterios: las muestras con coeficientes M/P menores o iguales de 0,3 se consideraron NEGATIVAS dentro de los límites de la prueba, cuando la relación M/P fue mayor o igual de 0,4 se consideraron POSITIVAS.

### **3.10. MÉTODO DE EVALUACIÓN DE CONSOLIDACIÓN PULMONAR**

Durante el inicio de la enfermedad, las lesiones macroscópicas de los pulmones se observan, lóbulos ligeramente inflamados y brillantes, de color púrpura, con una consistencia firme y más pesada que el tejido normal, presencia de pericarditis fibrinosa con áreas de consolidación de color púrpura en casos agudos y gris en los crónicos.

El método empleado por Piffer y Britto (1991), citado por Sobetiansky *et al* (2002) nos permite evaluar el área pulmonar afectada y calcular el índice de neumonía, mediante la evaluación macroscópica de las lesiones que consisten en áreas de consolidación de color púrpura (agudo) a gris (crónico). Las lesiones se encuentran casi siempre en las porciones ventrales de los lóbulos apicales y lóbulos cardíacos. El aspecto de los pulmones afectados semeja a pulmones atelectásicos sobre todo en la fase crónica de la enfermedad.

Durante el beneficio, se procedió a inspeccionar los pulmones de los animales en estudio, para lo cual se preparó una ficha donde fue anotada el área del lóbulo pulmonar afectado, siguiendo la metodología de los autores citados. La primera evaluación se realizó en base al porcentaje de participación de cada lóbulo en relación del peso total del pulmón. (Cuadro N° 3). Los lóbulos pulmonares fueron identificados con sus respectivas abreviaturas, apical derecho (AD), apical izquierdo (AI), cardíaco derecho (CD), cardíaco izquierdo (CI),

diafragmático derecho (DD), diafragmático izquierdo (DI) e intermedio (I); cada lóbulo tiene un porcentaje asignado en base al peso de cada uno de ellos y en relación al total del peso pulmonar.

Cuadro N° 3.- PORCENTAJE DE PARTICIPACIÓN DE CADA LÓBULO EN RELACIÓN DEL PESO TOTAL DEL PULMÓN.

<b>LÓBULO PULMONAR</b>	<b>% DEL PESO PULMONAR</b>
Apical derecho (AD)	11
Cardiaco derecho (CD)	11
Diafragmático derecho (DD)	34
Apical Izquierdo (AI)	06
Cardiaco izquierdo (CI)	06
Diafragmático izquierdo (DI)	27
Intermedio (I)	05

Fuente: Piffer & Brito(1991)

En dicho modelo, se le otorga una puntuación del 0 al 4 de acuerdo al porcentaje de consolidación pulmonar encontrado en cada lóbulo (Cuadro N° 4 y Figuras N° 1 y N° 2).

Cuadro N° 4.- PUNTUACIÓN SEGÚN LA EXTENSIÓN DE LA LESIÓN DE CONSOLIDACIÓN PULMONAR EN CADA LÓBULO.

<b>PUNTUACIÓN</b>	<b>EXTENSIÓN DE LA LESIÓN DE CONSOLIDACIÓN PULMONAR EN CADA LÓBULO (% DE ÁREA PULMONAR)</b>
<b>0</b>	Sin consolidación pulmonar
<b>1</b>	1 al 25
<b>2</b>	26 al 50
<b>3</b>	51 al 75
<b>4</b>	76 al 100

Fuente: Piffer & Brito(1991)

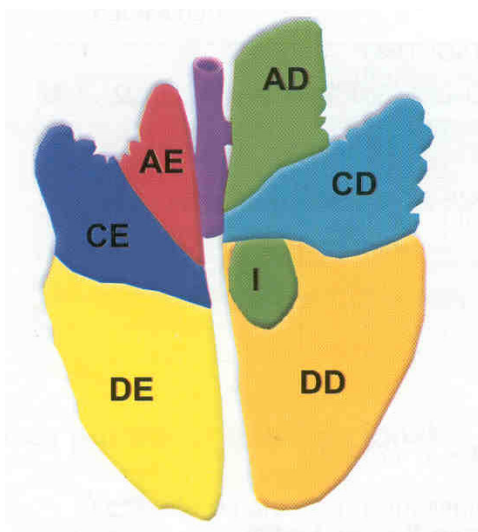


Grafico N° 1. Diseño esquemático del pulmón del porcino en posición dorsal

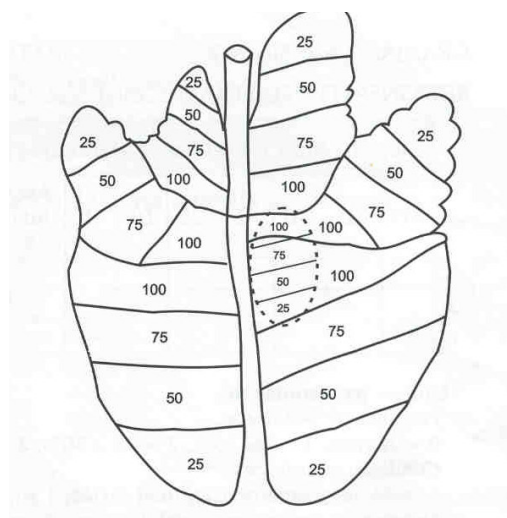


Grafico N° 2. División imaginaria de los lóbulos pulmonares en cuatro partes iguales

Figura 1. Distribución de los lóbulos en el pulmón de porcino. Lóbulos: **AE** -Apical Izquierdo; **CE** - Cardíaco Izquierdo; **DE** - Diagramático Izquierdo, **AD** - Apical derecho, **CD** - Cardíaco derecho, **DD** - Diagramático Derecho, **I**- Intermediario.

Cada puntuación tiene un valor asignado a cada lóbulo pulmonar y en relación a su peso (Cuadro N° 5), de acuerdo a esto, se obtiene una sumatoria de los valores asignados a cada lóbulo y el valor total dado expresado en porcentaje se ubica dentro de una categoría de consolidación (Cuadro N° 6). Esto, nos ayudó a calcular de manera rápida el porcentaje total de animales con neumonía (consolidación pulmonar) en los lotes trabajados.

El índice para neumonía IPP es calculado de la siguiente forma:

$$\text{IPP} = \frac{\text{índice total}}{\text{nº de animales examinados}} = \frac{a}{b} = a/b$$

Cuadro N° 5.- ÁREA DE CONSOLIDACIÓN PULMONAR POR LÓBULOS.

PUNTUACIÓN	ÁREA DE CONSOLIDACIÓN (%) POR LÓBULO PULMONAR						
	AD	CD	DD	AI	CI	DI	I
<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>1</b>	1.4	1.4	4.3	0.7	0.7	3.4	0.6
<b>2</b>	4.1	4.1	12.7	2.3	2.3	10.1	1.9
<b>3</b>	6.9	6.9	21.4	3.8	3.8	17.0	3.1
<b>4</b>	9.7	9.7	29.9	5.3	5.3	23.8	4.4

Finalmente el porcentaje obtenido se categorizó de acuerdo al Cuadro N° 6. y el cálculo del Índice de neumonía se hizo de acuerdo al Cuadro N° 7.

Cuadro N° 6. - PUNTUACIÓN RELATIVA A LAS CATEGORÍAS DE VOLUMEN DE CONSOLIDACIÓN PULMONAR.

CATEGORIAS	PORCENTAJE DE VOLUMEN DE CONSOLIDACIÓN (%)
<b>0</b>	0
<b>1</b>	0.1 a 11
<b>2</b>	11.1 a 21
<b>3</b>	21.1 a 31
<b>4</b>	31.1 a 41
<b>5</b>	41.1 a 51
<b>6</b>	51.1 a 100

Fuente: Piffer & Brito(1991)

Cuadro N° 7. - CÁLCULO DEL ÍNDICE DE NEUMONÍA DE LA GRANJA DE ACUERDO AL N° DE ANIMALES

<b>Categorías de Hepatización pulmonar</b>								
	0	1	2	3	4	5	6	Total
<b>N° de animales</b>	51	0	1	0	0	0	1	55
<b>Índice total por categoría</b>	51x0	0x1	1x2	0x3	0x4	2x5	1x6	18
<b>Identificación del pulmón</b>	5 a 55	0	1	-	-	2 y 3	4	

Por ultimo la interpretación de los resultados se muestra en el Cuadro N° 8

Cuadro N° 8.- INTERPRETACIÓN DE LOS VALORES OBTENIDOS EN EL CÁLCULO DEL ÍNDICE PARA NEUMONÍA (IPP)

<b>IPP</b>	<b>INTERPRETACIÓN</b>
<b>Hasta 0,55</b>	Granjas libres de neumonía
<b>De 0,56 a 0,89</b>	Granja donde la neumonía esta presente, pero no constituye una amenaza. Queda evidenciado que existen factores de riesgos y, caso no corregidos, la neumonía puede evolucionar y el índice alcanzar valores mayores.
<b>De 0,90 a más</b>	Representa una mala situación con ocurrencia grave de neumonía, tanto mayor mientras mas elevado sea el índice

Fuente: Dalla Costa *et al.* (2000).

### 3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La evaluación de la ganancia de peso en cada estudio se realizó mediante la prueba de Análisis de Varianza de una sola vía, después de demostrar la normalidad de la variable cuantitativa continua mediante la prueba de Kolmogorov Smirnov de una muestra. Para determinar el mejor grupo de estudio se utilizó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey. Adicionalmente, se evaluó el efecto del sexo y grupos de tratamiento sobre la ganancia de peso utilizando un análisis de varianza por arreglo factorial, para lo que se tomo en cuenta también la evaluación de la normalidad en la variable ganancia de peso. Los títulos de anticuerpos siguieron el mismo manejo

que la variable ganancia de peso. El grado de consolidación pulmonar fue evaluado utilizando la prueba de Kruskal Wallis y tomando el valor de consolidación pulmonar para cada individuo. Las diferencias fueron calculadas para un nivel de confianza del 95% y se utilizó el paquete estadístico SPSS 11.1.

Los datos recopilados para cada esquema de vacunación son resumidos en cuadros (ganancia de peso, título de anticuerpos y consolidación pulmonar) y curvas de tendencia (títulos de anticuerpos).

## IV.- RESULTADOS

El presente trabajo evaluó dos programas de vacunación en animales contra Neumonía Enzoótica procedentes de madres sin y con antecedentes de vacunación contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, este segundo estudio, las madres fueron vacunadas antes del parto con dos dosis de 2 ml. a las 5 y 3 semanas antes del parto.

- **ESTUDIO 1.-** PORCINOS PROCEDENTES DE MADRES SIN ANTECEDENTES DE VACUNACIÓN CONTRA *M. hyopneumoniae*.

El análisis de varianza no encontró diferencia del factor sexo sobre la ganancia de peso, por lo que este fue eliminado de los siguientes análisis. La evaluación de la ganancia de peso no reportó diferencias significativas entre los tratamientos. El detalle se muestra en el cuadro N° 9.

Cuadro N° 9.- Distribución de pesos finales de cerdos procedentes de madres sin antecedentes de vacunación contra *M. hyopneumoniae*.

ESTRATEGIA DE VACUNACIÓN	Número de animales	Media (Kg.)	Desviación estándar	Valores extremos	
				Mínimo	Máximo
Control	30	85.8 <sup>a</sup>	10.09	67.2	102.6
Vacuna (35-56d)	30	86.7 <sup>a</sup>	8.39	73.6	104.9
Vacuna (42-56d)	30	83.2 <sup>a</sup>	10.45	62.1	102.4
Monodosis(42d)	29	87.3 <sup>a</sup>	9.47	63.3	106.9

<sup>a,b</sup> Letras diferentes indican que las medias de los pesos son estadísticamente diferentes



Los títulos de anticuerpos fueron variando de acuerdo a la fecha de muestreo. Observándose que el grupo vacunado con dos dosis a los 35 y 56 días de edad, alcanzó un pico máximo a los 70 días al igual que el grupo vacunado a los 42 y 56 días. El grupo que recibió la vacuna monodosis tuvo el pico máximo de anticuerpos más tardíamente (112 días).

El grupo control tuvo una elevación de los títulos de IgG a partir de los 70 días alcanzando su pico máximo a los 112 días. Los grupos que recibieron dos vacunas, tuvieron una elevación de los anticuerpos IgG a partir de los 112 días de edad. Se observa que existen diferencias entre los grupos, predominando los valores más altos para el grupo vacunal 2 (35 y 56 días).

El comportamiento de las curvas se presenta en el gráfico 3 y el detalle de su distribución y las diferencias entre los grupos para cada fecha de muestreo se presenta en el apéndice 1.

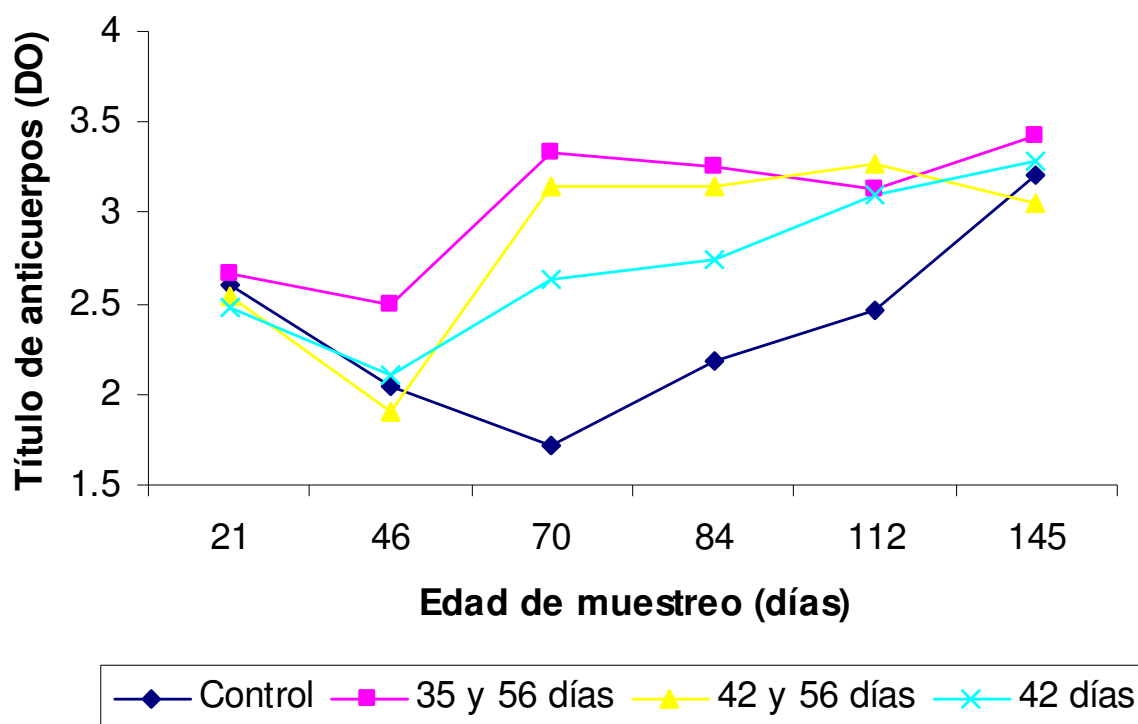


Grafico N° 3.- Título de anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae*

La respuesta serológica en la vacuna monodosis fue progresiva y constante, con un pico moderado, pero que finalmente iguala a los títulos de los animales de los diferentes grupos vacunales.

La evaluación del grado de consolidación pulmonar, varía según los grupos evaluados. Encontrándose diferencias significativas ( $p=0.006$ ). En orden descendente, los mayores grados de consolidación se observaron en los pulmones de los animales del grupo control en donde se llegaron a encontrar animales con grado de consolidación pulmonar de grado 6, 5 y 3; los que no se observaron en los grupos vacunados. La distribución de los animales según tratamiento y grado de consolidación pulmonar se presenta en el cuadro N° 10.

Cuadro 10.- Distribución de los grados de consolidación pulmonar en cerdos procedentes de madres sin antecedentes de vacunación contra *M. hyopneumoniae*.

Consolidación Pulmonar	Control	Vacuna (35-56d)	Vacuna (42-56d)	Vacuna monodosis (42d)
<b>0</b>	11	18	15	20
<b>1</b>	8	12	12	8
<b>2</b>	8	-	3	1
<b>3</b>	1	-	-	-
<b>4</b>	-	-	-	-
<b>5</b>	1	-	-	-
<b>6</b>	1	-	-	-
<b>N° de Porcinos</b>	30	30	30	29
<b>Índice Total</b>	38	12	18	10
<b>IPP*</b>	1.27	0.40	0.60	0.34

\* Índice para Neumonía

Los resultados del Índice de neumonía (IPP) fue de 1.27 para el grupo control que se interpreta como presentación de grave neumonía, los vacunados con 2 dosis (35 y 56 días) y los que recibieron monodosis (42 días) presentaron un IPP de 0.40 y 0.34, lo que significó que no presentaron neumonía y el grupo de animales vacunados con 2 dosis (42 y 56 días) presento un IPP de 0.60 lo que demuestra que la neumonía estaba presente, pero no constituyó una amenaza.

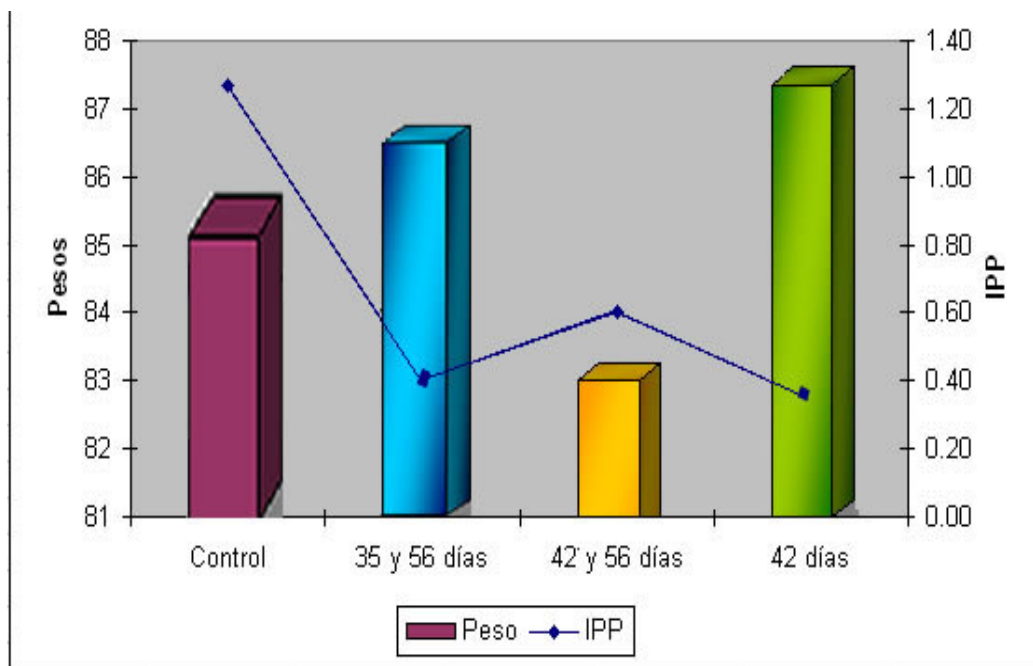


Gráfico No.4 Pesos finales vs. Índice de lesión pulmonar de porcinos nacidos de madres sin antecedentes de vacunación contra *Mycoplasma hyopneumoniae*

En el gráfico No.4, se puede observar los pesos finales versus Índice para neumónico; el grupo control presentó menor peso y mayor grado de lesión pulmonar a diferencia al grupo que recibió una dosis a los 42 días que tuvo mayor peso y menor grado de lesión pulmonar, aunque no se encontró significancia estadística.

- **ESTUDIO 2.-** EN PORCINOS PROCEDENTES DE MADRES CON ANTECEDENTES DE VACUNACIÓN CONTRA *M. hyopneumoniae*.

En este segundo estudio, el análisis de varianza no encontró diferencia del factor sexo sobre la ganancia de peso, por lo que este fue eliminado de los siguientes análisis. Tampoco se encontró diferencias significativas entre la ganancia de peso de los animales entre tratamientos. Sin embargo, si existió una tendencia a que los animales vacunados a los 42-56 días ganaran más peso en comparación a los demás grupos. El detalle de los resultados se muestra en el cuadro N° 11.

Cuadro 11.- Distribución de pesos finales de cerdos procedentes de madres con antecedentes de vacunación contra *M. hyopneumoniae*.

ESTRATEGIA DE VACUNACIÓN	Numero de animales	Media (Kg.)	Desviación estándar	Valores extremos	
				Mínimo	Máximo
Control	29	80.7 <sup>a</sup>	9.38	63.2	104.8
Vacuna (35-56d)	30	82.2 <sup>a</sup>	11.8	63.4	101.2
Vacuna (42-56d)	29	87.4 <sup>a</sup>	9.70	63.2	107.5
Vacuna uní dos(42d)	29	82.9 <sup>a</sup>	8.96	62.6	100.0

<sup>a,b</sup> Letras diferentes indican que las medias de los pesos son estadísticamente diferentes

Los grupos de animales que recibieron dos dosis presentaron seroconversión a causa de la vacunación observándose una elevación de anticuerpos a los 70 días de edad, y manteniéndose casi constante hasta el final del estudio. El perfil de anticuerpos del grupo vacunado con la monodosis se muestra diferente a los anteriores, observándose un pico con una elevación constante a partir de los 70 días de edad. Para el caso de los animales control, se observa una elevación de los anticuerpos hacia los 84 días de edad a causa del desafío de campo.

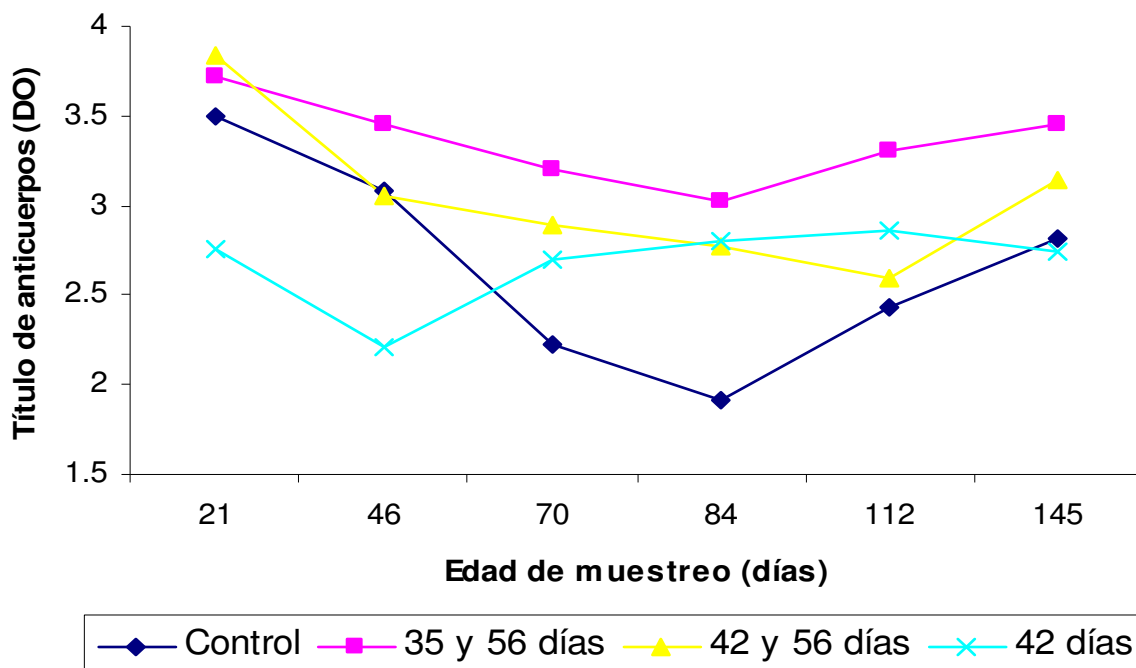


Grafico N° 5.- Títulos de anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae*

El comportamiento de las curvas se presenta en el Grafico 5 y el detalle de su distribución y las diferencias entre los grupos para cada fecha de muestreo se presentan en el apéndice 2.

La evaluación del grado de consolidación pulmonar no encontró diferencias significativas entre los grupos evaluados. Sin embargo, se observó una tendencia a que los pulmones de los animales del grupo control que presentaron mayor consolidación. En orden descendente, los mayores grados de consolidación se observaron en los pulmones de los animales del grupo control (grado 1= 14 porcinos, grado 2 = 3 porcinos y grado 4 =1 porcino), Vacuna 42-56 días (grado 1= 10 porcinos y grado 2 = 1 porcinos), Vacuna 35-56 días (grado 1= 8 porcinos y grado 2 = 2 porcinos) y Vacuna de dosis única (grado 1= 4 porcinos y grado 2 = 1 porcino y grado 4 = 1 porcino), respectivamente. La distribución de los animales según tratamiento y grado de consolidación pulmonar se presentó en el cuadro N° 12.

Cuadro 12.- Distribución de los grados de consolidación pulmonar en porcinos procedentes de madres con antecedentes de vacunación contra *M. hyopneumoniae*.

Consolidación Pulmonar	Control	Vacuna (35-56d)	Vacuna (42-56d)	Vacuna monodosis (42d)
<b>0</b>	13	20	19	22
<b>1</b>	14	8	10	4
<b>2</b>	2	2	1	1
<b>3</b>	-	-	-	-
<b>4</b>	1	-	-	1
<b>5</b>	-	-	-	-
<b>6</b>	-	-	-	-
<b>N° de Porcinos</b>	30	30	30	28
<b>Índice Total</b>	22	12	12	10
<b>IPP*</b>	0.73	0.40	0.40	0.36

- Índice para Neumonía

El Índice para neumonía (IPP) en el grupo control fue de 0.73, los grupos vacunados con 2 dosis (35 y 56 días), (42 y 56 días) y el grupo vacunado con una dosis presentaron un IPP de 0.40, 0.40 y 0.36 respectivamente, lo que significó que estaban libres de neumonía.

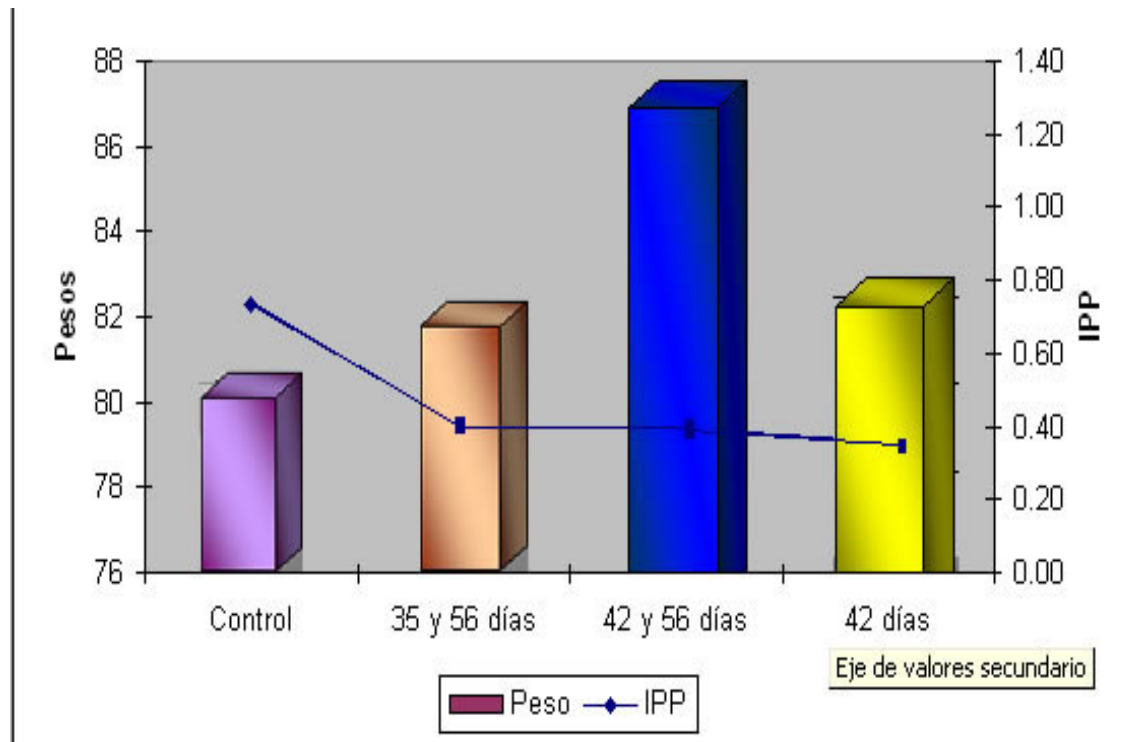


Grafico 6.-Pesos finales Vs. Índice de lesión pulmonar de porcinos nacidos de madres con antecedentes de vacunación contra *Mycoplasma hyopneumoniae*

En el grafico 6 se observa que el grupo control tuvo menor peso final y mayor grado de lesión pulmonar a diferencia del grupo que recibió dos dosis a los 42 y 56 días fue el que tubo mayor peso y menor grado de lesión.

## **V. DISCUSIÓN**

La neumonía enzoótica porcina es una enfermedad que forma parte del complejo respiratorio porcino la cual se distribuye a nivel mundial. El impacto de la enfermedad sobre la salud y productividad se ve reflejado en una disminución de la velocidad de crecimiento y una deficiente conversión alimenticia (Hill et al., 1992; Copes et al., 1995). Además, se presenta un alto porcentaje de decomisos de pulmones durante las inspecciones veterinarias debido a las lesiones neumónicas que pueden alcanzar hasta el 80% del parénquima pulmonar (Done, 1991).

El control de la enfermedad se puede realizar mediante la inmunización de las crías y/o reproductoras. No existe información sistematizada acerca del impacto de la vacunación en nuestro país. Los primeros intentos por enfrentar este problema se enfocaron a la vacunación de las reproductoras con la finalidad de que esta transmita inmunidad a través de los anticuerpos protectivos a la cría. La vacunación se realizaba generalmente seis semanas antes del parto, y se esperaba que las crías resulten protegidas. Al no tener los resultados esperados, la industria porcina adoptó el sistema de vacunación de las crías, las mismas que fueron aplicadas sin discriminar si es que procedían de una reproductora con o sin antecedentes de vacunación (Camacho, C. 2003).

**ESTUDIO 1.-** EN PORCINOS PROCEDENTES DE MADRES SIN ANTECEDENTES DE VACUNACIÓN CONTRA *M. hyopneumoniae*.

Aunque el estudio no reporta diferencias estadísticas en la ganancia de peso de los animales al final del estudio, se pudo observar una tendencia a favor de los animales que recibieron una sola dosis de vacuna (87.3 Kg.), de 1.5 Kg. superior en comparación con los animales controles.

La decisión de vacunar a los 42 y 56 días fue evitar la posible interferencia de los anticuerpos maternos transmitidos por las madres que fueron expuestas en forma natural. Sin embargo con la vacuna monodosis se obtuvo mejor peso (87.3 Kg.) en comparación con los demás tratamientos; pero estos no difieren grandemente de los pesos alcanzados por los animales que fueron vacunados con dos dosis a los días 35 y 56 (86.7 Kg.) que fue una diferencia de 0.6 Kg. a favor de los animales que recibieron monodosis; cuando se comparó los grupos con dos dosis la diferencia fue de 3.5 Kg. a favor de los animales vacunados a los 35 y 56 días vs. el grupo vacunado entre los 42 y 56 días de edad. La diferencia de peso final entre los animales vacunados con monodosis (87.3 Kg.) En comparación con los animales vacunados con dos dosis (42 y 56 días de edad) (83.2 Kg.) fue a favor de los animales vacunados con monodosis (4.1 Kg.). Indicándonos que ésta tiene un gran efecto dentro de las variables estudiadas. Por otro lado la vacunación de monodosis tiene la ventaja de inmunizar con una mayor carga antigénica, haciendo liberar el antígeno más lentamente, estimulando la respuesta inmune por mayor tiempo y persistencia, resultando el animal protegido y con mejor performance productiva.

En otros estudios realizados se encuentran resultados similares entre los investigadores. Thacker (2001) y Escobar et al., (2002) quienes coinciden con los resultados del presente estudio, concluyendo que la ganancia de peso entre animales vacunados y sus controles no fue significativa. Aunque en el estudio de Escobar et al., (2002) solo evaluaron los animales en la etapa de recría (donde la ganancia de peso es menor, en comparación con la etapa de engorde) lo que pudo haber influido en sus resultados finales. En cambio, Jensen *et al.* (2002), en un estudio de metáanálisis encuentra que la vacunación mejora la ganancia de peso en los animales.

La presencia de animales positivos en el primer muestreo nos indicaría que habría una transferencia de anticuerpos maternos a los lechones a



pesar que procedían de madres no vacunadas que probablemente habían estado expuestas al *M. hyopneumoniae* que se encuentra circulando dentro de la granja. En un estudio anterior realizado por Torres (2003) en madres no vacunadas, encontró que el 100% de crías de 1 semana de edad se encontraban seropositivas al inicio del estudio, concluyendo que ello se debía a la gran actividad del *M. hyopneumoniae* en la granja.

La evaluación de la curva de anticuerpos evidencia que todos los grupos vacunados alcanzan niveles basales en la medición del día 46 y que en la siguiente medición que ocurre al día 70 los niveles ya se encuentran elevados. Sin embargo, los niveles basales de anticuerpos en el grupo control se alcanzan al día 70 y que en las sucesivas mediciones éstas se elevan, probablemente asociado al reto de campo con *M. hyopneumoniae* que sufren estos animales (respuesta anamnésica).

La respuesta inmunológica expresada en títulos de anticuerpos resulta ser variada. Esto puede estar asociado a que la inmunidad de las reproductoras puede ser también variada, dado que no se encuentran vacunadas y están expuestas a diferentes gradientes de infección; y por lo tanto los anticuerpos maternos interferirían en la aplicación de la vacunación de los animales con diferentes grados de infección. Además, existe una variación innata para cada animal. Así Clark (1999) demostró que la respuesta inmunológica de las crías varía entre ellas según provengan de diferentes camadas, e inclusive dentro de los animales de la misma camada en vista que los lechones ingieren diferentes niveles de calostro.

En el estudio se observa que los animales vacunados con dos dosis alcanzan títulos de anticuerpos más altos, pero estos títulos descienden gradualmente, tornándose seronegativos al cabo de 4 a 6 semanas post vacunación, sin que signifique este hecho de que los animales no se encuentran protegidos contra la enfermedad. Posteriormente se produce el desafío de campo comportándose el *Mycoplasma* como un antígeno y el

sistema inmune nuevamente se vuelve a estimular para producir mayor cantidad de anticuerpos.

En cambio, se pudo observar que los animales vacunados con una dosis, desarrollan anticuerpos de forma más lenta, pero la tendencia a aumentar fue más prolongada, debido a la liberación lenta y sostenida de los antígenos vacunales.

El mismo comportamiento tienen los animales del grupo control. El desarrollo de los anticuerpos quizás debido al reto de campo fue más tardío, pero sostenido. Si bien es cierto los niveles de anticuerpos a partir del día 70 es claramente inferior a los grupos tratados, estos llegan a equipararse hacia el final de la crianza debido al desafío de campo.

El efecto de la interferencia de los anticuerpos maternos con la vacunación es de difícil valoración ya que ella depende de la cantidad y calidad de anticuerpos transmitidos de la madre a la cría mediante el calostro, durante los seis primeros días. Por ello la persistencia de los anticuerpos es también un tema controversial y de ello dependerá el grado de interferencia con el antígeno vacunal. Mientras que Calle *et al.* (2003) y Torres (2003) observaron que los anticuerpos transmitidos por las madres expuestas a infección natural y que no son vacunadas, persisten entre seis y ocho semanas, Wallgren *et al.* (1998) mencionan que los títulos de anticuerpos pueden decaer en algunos casos a las dos semanas de edad y en otros persistir entre 6.5 y 9 semanas de edad. En el estudio se observa que en la medición de la décima semana, los títulos de anticuerpos en el grupo control llegan a niveles más bajos, dejando expuesto al lechón al desarrollo de neumonías tempranas, con lo que se podría inferir que estos animales se encontraban con un alto nivel de anticuerpos maternos al inicio del estudio. Y luego decayeron a los 70 días para elevarse drásticamente por efecto del desafío de campo.

La evaluación del grado de consolidación pulmonar varió según los grupos evaluados. Los animales que alcanzaron mejores pesos y niveles de anticuerpos (vacuna 35-56 días y vacuna una dosis) presentaron un mayor porcentaje de animales en la categoría de pulmones con menor consolidación (grado 0 y 1), equivalente de 0 -25% de lesión pulmonar. En el grupo control se registró una mayor cantidad de animales con consolidación grado 1 y 2 (26 a 75%) de lesión pulmonar, y algunos con grado de consolidación mayor. Estos resultados sugieren una mayor protección de los esquemas de vacunación evaluados. Dawson et al. (2002b) menciona que el grado de consolidación pulmonar se ve reducido cuando los animales son vacunados. Sin embargo, variaciones en el estado sanitario de los animales debido a otras enfermedades, probablemente contribuyan a la variación en las lesiones pulmonares y otros parámetros de interés en el sistema productivo porcino (ganancia de peso, conversión alimenticia, etc.)

- **ESTUDIO 2.-** EN PORCINOS PROCEDENTES DE MADRES CON ANTECEDENTES DE VACUNACIÓN CONTRA *M. hyopneumoniae*.

No se encontraron diferencias significativas en la ganancia de peso obtenido por los animales al final de este estudio. Sin embargo, se observa un incremento en el peso a favor de los animales vacunados a los 42 y 56 días (87.4 Kg.) de 6.7 Kg. en comparación con el grupo control (80.7 Kg.). Al comparar los grupos que recibieron dos dosis de vacuna, la diferencia fue de 4.5 Kg. a favor del grupo vacunado a los 42 y 56 días vs. el grupo vacunado a los 35 y 56 días.

La diferencia entre los animales que recibieron una dosis (82.9 Kg.) vs. el grupo control (80.7 Kg.) fue de 2.2 Kg. a favor de los animales que recibieron una dosis. Los hallazgos no fueron significativos, probablemente debido a la variabilidad entre las ganancias de pesos de los animales entre los diferentes grupos.

Sin embargo, Dolso *et al* (2001) comparó 3877 animales sin vacunar (grupo control), versus 3400 animales vacunados con una sola dosis y 3863 animales con dos dosis, todos provenientes de madres vacunadas y concluyó que hubo diferencia en la ganancia diaria de peso a favor de los animales vacunados con una sola dosis (853 gr. GDP) con respecto a los sin vacunar (801 gr. GDP) y a los de dos dosis (799 gr. GDP). Sin embargo no observó diferencia entre los sin vacunar versus los vacunados con dos dosis.

Dado que los animales de nuestro estudio provienen de madres con antecedentes de vacunación, ellos llegan con niveles de anticuerpos elevados (si se compara con los del estudio 1). A partir de la tercera medición de anticuerpos (Día 70) se observa que los animales vacunados con dos dosis los días 35 y 56 de edad, alcanzan los mayores títulos. Pero comparando los resultados de las mediciones de los títulos de anticuerpos, se observó que los animales del grupo inmunizado con monodosis fueron bastante elevados en comparación con los otros grupos. Ello es de difícil interpretación. Confirmando la teoría que no existe relación entre el nivel de anticuerpos séricos y protección.

El comportamiento de la tendencia de los niveles de anticuerpos no sigue un patrón similar a la observada en el estudio anterior. En este caso se observa que existe una tendencia a disminuir hasta el día 84 y después se observa una subida de estos niveles con una pendiente poco pronunciada. Esto podría estar indicando que existe inicialmente una posible interferencia entre los anticuerpos maternos y la vacunación y que el aumento posterior de estos títulos se deberían mas a una estimulación por infección de campo que por estímulo vacunal, pero al observarse una pendiente poco pronunciada, la explicación estaría dada por el hecho de que el desafío de campo fue menor en este caso. Coincidiendo con lo encontrado por Dolso *et al* (2001).

La decisión de vacunar a los 42 días buscaba evitar posibles interferencias con los anticuerpos maternos provenientes de las madres vacunadas. Sin embargo, se observa que ello no se logra en este segundo estudio y se puede inferir que en casos de lechones que provienen de madres con antecedentes de vacunación, probablemente se haga necesario alargar el momento de la inmunización evaluando previamente el estatus del hato. Si se considera que la seroconversión se encuentra asociada a la pérdida de inmunidad materna y momento en el que el *M. hyopneumoniae* comienza a reproducirse en el tracto respiratorio, entonces se puede deducir que este proceso ocurre mas tardíamente en los animales que provienen de madres vacunadas que aquellos que provienen de madres no vacunadas. Carranza *et al* (2004), demostró que la inmunidad pasiva de lechones provenientes de madres vacunadas, interferían con la respuesta inmune medida por ELISA, cuando estos se vacunaban con altas concentraciones de Ac entre 21 y 45 días de edad y que además dependiendo de la vacuna usada, estos Ac podrían permanecer en los lechones por mas de 70 días.

También se puede inferir que la transmisión de los anticuerpos maternos son protectivos para la cría, y que esto se demuestra con un alargamiento del periodo en que los animales son infectados y comienzan a seroconvertir. Wallgren (1998) menciona que la edad en el que los animales se infectan depende del balance entre las inmunoglobulinas protectoras provenientes del calostro materno y la carga patógena en la piara. Esta respuesta resulta positiva más aun si consideramos que el incremento de microorganismos en la piara se ve favorecido con la época del año en el que se ha realizado el estudio. Las condiciones ambientales de las estaciones de otoño e invierno suelen ser favorables para la diseminación de la enfermedad en el hato, debido al clima frío y alto porcentaje de humedad.

En general, la persistencia y nivel de anticuerpos calostrales protectores frente al *M. hyopneumoniae* es variable y depende de factores como la edad y nivel de infección de las madres. En varios trabajos

realizados por Dieckman, M, *et al* 1999, Jayappa, H.*et al* 2001 y Burch, D. 2003b, se indican que la respuesta vacunal de los lechones es inferior cuando están protegidos por anticuerpos maternos y que más importante que la edad en la primera vacunación es el nivel de anticuerpos maternos presentes en el momento de la vacunación. Esto no significa que los lechones deban ser completamente seronegativos a Mh, ya que niveles bajos de inmunidad pasiva no interfieren en una respuesta positiva a la vacunación.

La evaluación del grado de consolidación pulmonar muestra que los animales que recibieron algún esquema de vacunación, la mayoría de animales vacunados presentaban el nivel mas bajo de consolidación pulmonar (grado 0) equivalente a 0% de lesión pulmonar. Sin embargo, los animales controles, en su mayoría presentaban grado 1 a > grado de consolidación pulmonar, (> a 26% de lesión pulmonar), con lo que se demuestra que los anticuerpos, tanto provenientes de la inmunidad pasiva como de la inmunidad activa fueron protectivos evitando la infección y el daño pulmonar. Dawson *et al.* (2002b) menciona que el grado de consolidación pulmonar se ve reducido cuando los animales son vacunados, ello parece también favorecido por la vacunación de la madre. Evidentemente, como en el caso del experimento anterior, variaciones en el estado sanitario de los animales asociado a otras enfermedades, probablemente contribuyan no solo a la variación en el grado de las lesiones pulmonares sino que también sobre otros parámetros productivos de importancia para la actividad porcina.

La toma de decisiones para vacunar a los animales de un hato no puede ser uniforme para todos los casos. Ello ha de depender de cual es la condición sanitaria del mismo. Quilan (1998) menciona que las granjas con elevados títulos de anticuerpos deberían retrasar la inmunización, así como aquellas en las que se observa niveles de anticuerpos bajos al monitoreo serológico, deberían de adelantar la vacunación.

Existen esquemas de vacunación contra *M. hyopneumoniae* que consideran vacunación precoz. Ello no debe ser de tomado en cuenta sin antes haber realizado un perfil serológico y valorado el status sanitario del hato. En el Perú, la mayoría de granjas porcinas utilizan diversos esquemas de vacunación, recomendándose que debemos tener en cuenta para fijar un determinado esquema de vacunación, el nivel de inmunidad pasiva, el tipo de vacuna a utilizar y además determinar el momento tal que permita a los animales estar protegidos en las situaciones de mayor estrés como son el momento del destete, y el termino de la fase de recría e inicio del crecimiento-acabado.

En general, se debe de inmunizar a los animales con una bacterina contra el micoplasma porcino en zonas donde el patógeno es prevalente. Sin embargo, la valoración del esquema de vacunación dependerá del monitoreo serológico que se haga en cada granja. No existe un esquema único. El mejor ha de ser aquel que permita que los animales adquieran una inmunidad protectora que impida que desarrollen la enfermedad y que obtengan mayores ganancias de peso, una edad más temprana para el beneficio y mejores tasas de conversión alimenticia.

Los esquemas de vacunación a los lechones también dependerá si la madre tiene antecedentes de vacunación o no. Una recomendación hecha en el MERCOSUR (Rio cuarto) indica que si no se vacuna a la madre, se debe de vacunar a los lechones con 2 dosis o con monodosis a una edad temprana. Si se vacuna a la madre, la vacunación de los lechones ha de realizarse a los 60 días de edad con o sin revacunación, coincidiendo con una de las conclusiones del presente estudio. Una tercera alternativa indicada fue vacunar las madres y no vacunar a los lechones.

## **VI. CONCLUSIONES**

1. En los esquemas de vacunación evaluados no se observó diferencia significativa en la ganancia de pesos en los porcinos procedentes de madres sin y con antecedentes de vacunación.
2. La inmunidad materna influye sobre los niveles de anticuerpos y la respuesta post-vacunación de los lechones, dependiendo si los lechones provienen de madres con o sin antecedentes de vacunación.
3. El IPP resultó ser significativamente menor en los lechones vacunados procedentes de madres sin antecedentes de vacunación. En caso de los lechones procedentes de madres con antecedentes de vacunación, la tendencia es similar (sin llegar a ser significativa la diferencia).



## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Si se debe recomendar la vacunación contra *Mycoplasma hyopneumoniae* ya que de acuerdo a los resultados obtenidos se logra reducir las lesiones pulmonares, mejorando los parámetros productivos (ganancia de peso, e Índice Para Neumónico).
2. Antes de determinar un programa de vacunación, se debe realizar un perfil de anticuerpos en las primeras 6 semanas de vida.
3. Tomar en cuenta que la enfermedad es dinámica y que cada explotación debe seleccionar el programa de vacunación que más le conviene en función de su situación particular, en base a las condiciones ambientales, de manejo, época del año, sistema de producción, status sanitario, grado de desafío y nivel de bioseguridad.
4. Se debe recomendar la aplicación de monodosis cuando la exposición a *Mycoplasma* es baja.
5. La vacunación con dos dosis se debe recomendar cuando existe un alto desafío de patógenos respiratorios, y en granjas de Flujo continuo o granjas que no puedan llevar un sistema estricto del sistema Todo dentro /Todo fuera.
6. Postergar la vacunación hasta que los niveles de anticuerpos maternos desciendan, expone a los animales al riesgo innecesario de contraer enfermedades respiratorias.

## **VIII.- BIBLIOGRAFIA CITADA**

1. **Ackermann, MR**; DeBey, MC; DeBey, BM. 1991. Bronchiolar metaplasia and Ulex europaeus agglutinin I (UEA-I) affinity in *Mycoplasma hyopneumoniae*-infected lungs of six pigs. Vet. Pathol. 28: 533-535.
2. **Almagor, M**; Kahane, I; Gilon, C; Yatziv, S. 1986. Protective effects of the glutathione redox cycle and vitamin E on cultured fibroblasts infected by *Mycoplasma pneumoniae*. Infect Immun 52: 240-244.
3. **Amanfu, W**; Weng, CN; Ross, RF; Barnes, HJ. 1984. Diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine: sequential study by direct immunofluorescence. Am. J. Vet. Res. 45:1349-1352.
4. **Andrada, M**. 2001. Estudio etiopatogénico de la neumonía enzoótica porcina (NEP). Tesis Doctoral Facultad de Veterinaria. Universidad de las Palmas de Gran Canaria.
5. **Andrada, M**; Fernández, A.; Del Pozo, M. y Sánchez Vizcaíno, JM. 2002. Neumonía Enzoótica. En curso virtual de enfermedades de los cerdos. Ed Sánchez Vizcaíno.
6. **Anónimo**. 2002 S/F. Taking closer look at *Mycoplasma hyopneumoniae*. S/f. *Internacional Pigs Topics*. 17(6):19-23.
7. **Armstrong, C**. 1982. Neumonía por mycoplasma en el cerdo. *Internacional Swine Update*. SQUIBB. Jul. 1: 6-8.

8. **Artiushin, S.** y Minion, F. 1996. Arbitrarily primed PCR analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates demonstrates genetic heterogeneity. *Int Syst Bacteriol* 46:324-328.
9. **Baekbo, P.** 1999. Procedures to eliminate M. hyo and produce M. hyo free pigs: an update. Proceeding of American Association of Swine Practitioners annual meeting. St. Louis. 479-481.
10. **Baekbo, P.** 2000. Management concepts to control pneumonia. *Pig progress. Respiratory diseases IV.* p: 12-14.
11. **Baskerville,** 1981. Pneumoniae of pigs: a review. *NZ. Vet. J.* 29:216-218.
12. **Bazer, F.W.;** Ford, J.J.; Kesinger, R.S. 2001. Reproductive Physiology. Chapter 5. In: *Biology in Domestic pig.* Editors Pond W.G. & Mersmann H.G. Cornell University Press, Ithaca. p. 150-224.
13. **Bej, AK;** Mahbubani, MH; Atlas, RM. 1991. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their application. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26:301-334.
14. **Bereiter, M.;** Young, T.; Joo, H.; Ross, R.F. 1990. Evaluation of the EN and comparison to the complex fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies of *Mycoplasma hyopneumoniae* swine serum. *Vet. Microbiol.* 25: 177-192.
15. **Betts, A.** 1952. Respiratory diseases of pigs. V. Some clinical and epidemiological aspects of virus pneumonia of pigs. *Vet. Rec.* 64:283-288.
16. **Bhogal, B.S.;** Deaylu, K.I.; Reich, R.L. 1992. Preferential stimulation of cell mediated immune (CMI) responses in bronchial lymph nodes (BLN) of pigs vaccinated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *IVPS. Proc.* 298.
17. **Blanchard, B.;** Venna, M.; Cavalier, A.; Le Lannic, J.; Gouranton, J. y Koobisch, M. 1992. Electron microscopic observation of the respiratory

tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Microbiol 30(4):329-341.

18. **Blood, DC.;** Radostits, O.; Clive, D. Hinchellf, K. 2000. Medicina Veterinaria, Tratado de las enfermedades del Ganado bovino, porcino, caprino y equino. 9° Ed. Vol. I. Madrid, España. Ed. Mc Graw Hill. p. 1195-1204.
19. **Brown, S;** Teplitz, M; Revel, J. 1974. Interaction of mycoplasmas with cell cultures as visualized by electron microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71: 464-468.
20. **Bolske, G.;** Strandberg, M. L.; Bergstrom, K.; Johansson, K.E. 1987. Species-specific antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* and cross-reaction with other porcine mycoplasma. *Curr. Microbiol.* 15:233-239.
21. **Bosch G.** Zhou C: 2000 Using nested PCR and serology to determine disease patterns in herds dually infected with PRRS virus and *Mycoplasma hyopneumoniae* in proceeding of the 16<sup>th</sup> IPBS Congress Melbourne, Australia p451.
22. **Burch, D.** 2003a. Mycoplasma vaccination - One shot or two?. Pig World. En <http://www.octagon-services.co.uk>. Miércoles, 18 de Febrero del 2004.
23. **Burch, D.** 2003b. Mycoplasma vaccines & Passive immunity the effect of maternally deliverers antibodies and piglet age vaccinal response. Pig World. En <http://www.octagon-services.co.uk>. Miércoles, 18 de Febrero del 2004
24. **Camacho, C.** y Calle, S. 2003. Neumonía Enzoótica Porcina. Mundo Avícola y Porcino. 45:48-51.

25. **Camacho, C.** 2004. Neumonía a micoplasma, un tema de actualidad en la porcicultura intensiva. Rev. Mundo Vet. Año 2 (5). Abril. 22-24.
26. **Calle, S.;** Camacho, C.; Torres, M.; Falcón, N.; Cerón, M. Y Zacarías, E. 2003. Inmunidad natural e inducida contra *Mycoplasma hyopneumoniae* medida desde el nacimiento hasta la edad de mercado en cerdos bajo crianza intensiva. Mundo Avícola y Porcino. Feb. 44: 48-49.
27. **Caron, J;** Ouardani, M; Dea, S. 2000a. Diagnosis and Differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* Infections in Pigs by PCR Amplification of the p36 and p46 Genes. Journal of Clinical Microbiology; 38 (4): 1390-1396
28. **Caron, J;** Sawyer, N; Ben Abdel Moumen, B; Cheikh Saad Bouh, K; Dea, S. 2000b. Species-Specific Monoclonal Antibodies to Escherichia coli-Expressed p36 Cytosolic Protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology; 7(4): 528-535.
29. **Carter, GR.** 1991. Bacteriología y Micología Veterinaria: Aspectos Esenciales. Manual Moderno: México. p: 288-291.
30. **Caruso, JP.** y Ross, RF. 1990. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infections on alveolar macrophage functions in swine. Am J Vet Res.; 51(2): 227-31.
31. **Calsamiglia, M.;** Piojan, C.; Bosch, G. 1999. Porfiling *Mycoplasma hyopneumoniae* in farms using serology and nested PCR technique. *Swine Health Prod.* 7(6): 263-268.
32. **Casique, PS.** 2002. *Mycoplasma hyopneumoniae*: Nuevos hallazgos en el mecanismo de acción en la respuesta celular inmune. Boletín técnico Pfizer Salud Animal.

33. **Chang, B.** 2001. Intraspecies differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* field strains isolated in the United States. American Association of Swine Veterinarians. pp: 225-227.
34. **Chen, J.;** Lin, J.; Weng, C.; Lai, S. 1998. Identification of a novel adhesin-like glycoprotein from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiology*. 62: 97-110.
35. **Chen, YL;** Wang, SN; Yang, WY; Chen, YJ; Lin, HH; Shiuan, D. 2003. Expression and Immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* Heat Shock Protein Antigen P42 by DNA Vaccination. *Infect Immun*; 71(3): 1155-1160.
36. **Chou, SY;** Chung, TL; Chen, RJ; Ro, LH; Tsui, PI; Shiuan, D. 1997. Molecular cloning and analysis of a HSP (Heat Shock Protein)-like 42 KDa antigen gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Biochem Mol Biol Int*; 41: 821 – 831.
37. **Chung, TL.;** Farh, L.; Chen, YL.; Shiuan, D. 2000. Molecular cloning and characterization of a unique 60 kDa/72 KDa antigen gene encoding enzyme I of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Biochem (Tokyo)*; 128(2): 261-9.
38. **Ciprian, A.;** Pijoan, C.; Cruz, T; Camacho, J.; Tortora, J.; Colmenares, G.; López, R.; Garza de la, M. 2001. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. *Can. J. Vet.Res.*, 52: 434-438.
39. **Clark, L.;** Armstrong, C.;; **Scheid, A VanAistine WG.** 1993. The effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection on growth in pigs or without environmental constraints. *J. Swine Health Prod.* 1(6): 10-14.
40. **Clark, K.** 1997. Control or eradication of mycoplasmal pneumonia. *Proceedings of the Iowa State University Veterinary Medicine Seminar.* 8-10.

41. **Clark, K.L.** 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae*: Serology/Vaccinology. Prude University College of Veterinary Medicine. *American Association of Swine Practitioners*. p. 365-369.
42. **Congress** Reports gains from Mycoplasma Vaccination. 2000. *Pig International* 30(11):31.
43. **Copes, J.;** F. Nievas; R. Cerda; C. Perfumo. 1995. Aislamiento y caracterización de *Mycoplasma* sp. de pulmones de cerdos provenientes de mataderos. *Analecta Veterinaria* 15: 27-30.
44. **Cornaglia, E.** 2002. *Mycoplasma hyopneumoniae* titration: A powerful tool to understand antibody levels. Proceedings of the 33rd annual meeting of the American Association of Swine Veterinarians, Kansas City, 83.
45. **Dawson; A** Harvey, RE Thevasagayam, SJ; Sherington, J; Peters, AR 2002b. Studies of the field efficacy and safety of a single dose *Mycoplasma Hyopneumoniae* vaccine for pigs. *The Veterinary Record*; 2: 535 – 538.
46. **Dayalu, K.** 1990. Vaccine Research Findings. Smithkline Beecham Animal Health *Mycoplasma Pneumonia* Symposia May 29,31,1990; August 22,23,24,1990.
47. **DeBey, M.;** Jacobson, C.; Ross, R. 1992. Histochemical and morphologic changes of porcine airway epithelial cells in response to infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* 53:1705-1710.
48. **DeBey, M;** Roth, JA; Ross, RF. 1993. Enhancement of the increase in intracellular calcium concentration in stimulated neutrophils by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Res. Commun.* 17: 1481-1488.
49. **DeBey, M.;** Ross, R. 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infection and Immunity* 62(12): 5312-5318.

50. **Desmettre, P.;** Le Portier, M.; Abiven, P.; Kobisch, M. y Crevat, D. 1994. A blocking ELISA using a monoclonal antibody for the serological detection of mycoplasma. *Res Vet Sci.* May. 56(3): 45-338.
51. **Desrosiers,** 2001 A review of some aspects of the epidemiology, diagnosis, and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. *J. Swine Health Prod.* 9(5): 233-237.
52. **Deyalu, K.I.;** Keich R.L.; Charlier, P.; Martinod, S. 1992. Evaluation of the beneficial effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine RespiSure® results from collected and Field studies. *Proceedings of the 10<sup>th</sup> IVPS Congress.* p. 302.
53. **Dieckman, M.;** Scheidt, A.; Gant, A.; Dant.; Sutton, A.; Truman, M. y Cline, T. 1999. Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on health, growth, and pubertal status of gilts exposed to moderate ammonia concentrations in-all-in-out versus continues-flow systems. *Swine Health Prod.* 7(2): 55-61.
54. **Djordjevic, SP;** Eamens, EG; Romalis, LF; Nicholls, PJ; Taylor, V; Chin, J. 1997. Serum and mucosal antibody responses and protection in pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with vaccines containing a denatured membrane antigen pool and adjuvant. *Aust Vet J*;75: 504-511
55. **Dolso,I,** Pelliza, B. y Ambrogi, A. 2001. GDP en animales con distintos regimenenes de vacunación contra *Micoplasma hyopneumoniae*. Reunión GITEP
56. **Donham, K.** 1991. Association of environmental air contamination with disease and productivity in swine. *AM J Vet Res.* 52: 1723-1730.
57. **Doster, AR** y Lin, BC. 1988. Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* in formalin-fixed porcine lung, using an indirect immunoperoxidase method. *Am J Vet Res* 49: 1719-1721.



58. **Dungwoth, D.L.** 1993. The respiratory system. In: Pathology of domestic animals. Ed. Jubb K.J.K., Kennedy P.C. and Palmer, N. 4<sup>th</sup> Edition. Vol. 2. pp. 661-663. Academic Press, New York, NY.
59. **Etheridge J.;** Cottew, G. y Lloyd, L. 1979a. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from lesions in experimentally infected pigs. Aust Vet J 55:356-359.
60. **Farrington D. O.** 1976. Immunization of swine against mycoplasmal pneumonia. Proc 4<sup>th</sup> Int Congr Pig Vet Soc, Iowa State Univ, p.4.
61. **Feelstrom, C.** y Wallgren, P. 1992. The relationship between seroconversion to *Mycoplasma hyopneumoniae* and lung findings to slaughter. IPVS, 12:308.
62. **Feld, N.;** Qvist, P. y Ahrens, P. 1992. Monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. Veterinary Microbiology. 30: 35-46.
63. **Frey, J.;** Haldimann, A.; Kobisch, M.; Nicolet, J. 1994. Immune response against the L-lactate dehydrogenase of *Mycoplasma hyopneumoniae* in enzootic pneumonia of swine. *Microb. Pathog.* 17: 313-322.
64. **Freeman, M.;** Armstrong, C.; Sands-Freeman, L. y López-Osuma, M. 1984. Serological cross-reactivity of porcine reference antiserato *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. flocculare*, *M. hyorhinis* and *M. hyosynoviae* indicated by the enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation and indirect hemagglutination test. Can J Comp Med. Apr. 48(2): 202-207.
65. **Friis, NF.** y Szancer, J. 1994. Sensitivity of certain porcine and bovine mycoplasmas to antibacterial agents in a liquid medium test compared to a disc assay. Acta Vet. Scand; 35: 389-394.

66. **Fuentes, M.** 2000. "Entendiendo el complejo respiratorio porcino". Venezuela Porcina. En [http://www.e-campo.com/sections/news/display.php/uuid.46914\\_DF4\\_-3E3D-11D4-A53C0006292E2740/](http://www.e-campo.com/sections/news/display.php/uuid.46914_DF4_-3E3D-11D4-A53C0006292E2740/) . Viernes, 02 de julio del 2004.
67. **Gardner, IA.** y. Hird, DW. 1990. Host determinants of pneumonia in slaughter weight swine. *Am J Vet Res*, 51(8)1306-11.
68. **Gois, M.;** Kursa, F y Sisak, F. 1980. Microbiological finding in the lung of slaughter pigs. Proc 6<sup>th</sup> Int Congre Pig Vet Soc Copenhagen. 6:214.
69. **Goodwin, R.;** Pomerov, A. y Whittlestone, P. 1965. Production of enzootic pneumonia in pigs with a mycoplasma. *Vet Rec* 77:1247-1249.
70. **Goodwin, R.** 1972a. Isolation of *Mycoplasma suis* pneumoniae from the nasal cavities and lungs of pigs affected with enzootic pneumonia or exposed to this infection. *Res Vet Sci* 13:262-267.
71. **Goodwin, R.** 1972b. Experiments on the transmissibility of enzootic pneumonia of pigs. *Res Vet Sci* 13:257-261.
72. **Goodwin, M.** 1982. Neumonía Enzoótica Porcina. International Swine Update. SQIBB. Jul. 1:1-8.
73. **Goodwin, RFW.** 1985. Apparent reinfection of enzootic pneumonia-free pig herds: search for possible causes. *Vet. Rec.* 116:690-694.
74. **Gulrajani, T.** y Beveridge, W. 1951. Studies on respiratory diseases of pigs. IV. Transmission of infectious pneumonia and its different action from swine influenza. *J Comp Pathol* 61:118-139.
75. **Halbur, P.** 1997. Making the diagnosis with serology, antigen detection and PCR. Proceedings of the Iowa State University Veterinary Medicine Seminar. 3-7.

76. **Halbur, P.G.** 1998. Porcine respiratory disease. In: Proceedings of the 15<sup>th</sup> Congress of the International Pig Veterinary Society, Birmingham, UK. Nottingham University Press, Nottingham, UK pp.1-10. Iowa State University 2003. 'Enzootic Pneumonia of Pigs' [online]. Available: <http://www.spc.int/rahs/Manual/Porcine/ENZOOTICPNEUMONIA.HTM>.
77. **Haldimann, A;** Nicolet, J; Frey, J. 1993. DNA sequence determination and biochemical analysis of the immunogenic protein p36, the lactate dehydrogenase (LDH) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. J. Gen. Microbiol. 139: 317-323.
78. **Harasawa, R;** Koshimizu, K; Takeda, O; Uemori, T; Asada, K. y Kato, I. 1991. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by the polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes 5:103-109
79. **Hill, MA.;** A.B. Scheidt; R.F. Teclaw; L.K. Clark; K.E. Knox; M. Jordan. 1992. Association between growth indicators and volume of lesions in lung from pigs at slaughter. Am. J. Vet. Res. 53: 2221- 2223.
80. **Hjärre, A.,** 1958. Enzootic virus pneumonia and Glasser's disease of swine. Academy Press, New York and Londres. Advances in Vet Sci.4:235.
81. **Huallanca, A.C.** 1999. Determinación de reactores a *M. hyopneumoniae* en cerdos sacrificados en un camal frigorífico. Tesis. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos. Lima. 32 p.
82. **Hsu, T.;** Aetiushin, S.; Minino, F. 1997. Cloning and functional analysis of the P97 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. J. Bacteriol. 179 (4): 1317-1323.
83. **Hsu, T.;** Minion, F. 1998. Molecular analysis of the p97 cilium adhesin operon of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Gene 214: 13-23.

84. **Holmgren, N.;** Gerth-Lofsted, H.; Bergstrom, J. y Wallgren, P. 1994. Prevalences of some respiratory pathogens indifferent piglet breeding systems. *IPVS*, 13:130.
85. **Hurley, T.; S. Chaudhary; J. Kliebenstein; J. Mckean; S. Westercamp.** 1995. Cost of Respiratory Disease. Swine Research Report, Iowa State University, Ames, IA. 154-156.
86. **Ibarra, M.A.** 2000. Evidencia de la presencia de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos provenientes de granjas de crianza artesanal del sur de Lima. Tesis. Fac. Med. vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos. Lima. 46 p.
87. **Janke, B.** 1997. Pathogenesis of mycoplasmal pneumonia, samples for diagnosis. Proceedings of the Iowa State University Veterinary Medicine Seminar. 1-2.
88. **Jayappa, H.;** Davis, R.; Rapp-Gabrielson, V.; Wasmoen, T.; Thacker, E.; Thacker, B. 2001. Evaluation of the efficacy of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin following immunization of young pigs in the presence of varying levels of maternal antibodies. Proceedings, American Association of Swine Veterinarians 32<sup>nd</sup> annual: 273-241.
89. **Jensen, CS;** Ersbolla, AK; Nielson, JP. 2002. A meta-analysis comparing the effects of vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae* on daily weight gain. *Proceedings 9th Int Soc Vet Epid & Econ*, 641-643.
90. **Joo, HS;** Suh, DK; Rutten, S. 1988. Evaluation of control protocols for *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in swine farms. *Sci/Vet Med Bldg*
91. **King, KW;** Faulds, DH; Rosey, EL; Yancey, RJ. 1996. Characterization of the gene encoding Mhp1 from *Mycoplasma hyopneumoniae* and examination of Mhp1's vaccine potential. *Vaccine*; 15:25-35.

92. **Kirk, L.** 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae*: serology / vaccinology. American association of Swine Practitioners. 365 – 368.
93. **Kristensen, Ch.**; Adreasen, M.; Ersboll, A.; J. 2004. Respuesta de los anticuerpos en cerdas y lechones luego de la vacunación contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* toxigénica y *Actinobacillus*. Can Journal Veterinary Research. Vol68 No. 1. P: 66-70.
94. **Kobisch, M.**; Labbé, A.; Morvan, P. y Cariolet, R. 1994. Evaluation of a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine in pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida*. IPVS, 13:194.
95. **Kobisch, M.**; Friis, N.1996. Swine mycoplasmosis Rev. Sci. Tech. 15(4):1569-1605.
96. **Kwon, D.**; Chae, C. 1999. Detection and localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA in lungs from naturally infected pigs by In Situ hybridization using digoxigenin-labeled probe. *Vet. Pathol.* 36:308-313.
97. **Kwon, D.**; Choin C.; Chae, C. 2002. Chronologic localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs. *Vet. Pathol.* 39: 584-587.
98. **Kuhn, M.** 2000a. RespiSure-One®: la misma protección confiable en una nueva fórmula. Topics in Veterinary Medicine. Vol 10 n° 2. Pfizer División de salud Animal. Pennsylvania.
99. **Kuhn, M.**; Thacker, B.; Hawkins, P.; Waters, W.; Thacker, E. 2000b. Evaluation of the Mode of Action of RespiSure® *Mycoplasma hyopneumoniae* Bacterin. *Proceedings, American Association of Veterinary of Swine Practitioners.* 123.
100. **Kuhn, M.** 2003. RespiSure-One®: Duración de la inmunidad en cerdos jóvenes con anticuerpos maternos contra *M. hyopneumoniae*. Pfizer Salud

Animal Boletín Técnico. Animal Health Group Pfizer Inc New Cork, NY 10017. Febrero 2003.

101. **León, E.A.**; Madec, F.; Taylor, N.M.; Kobisch, M. 2001. Seroepidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs from farrow-to-finish farms. *Veterinary Microbiology* 78(4): 331-3341.
102. **Le Portier, M.**; Abiven, P.; Kobisch, M. 1994. A blocking ELISA using monoclonal antibody for the serologic detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Reserch in Veterinary Science*. 56: 338-345.
103. **Lium, B.**; Lund, A. y Skomsky, A. 1994. A field study on vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *IPVS*, 13:191.
104. **Livingstong, C.**; Stair, E.; Underdahl, N.; Mebus, C. Maes, 1996. Pathogenesis in mycoplasmal pneumonia in swine. *Am. J. Vet. Res.* 33:2249-2258.
105. **Maes, D.**; Verdonck, M; Verbeke, W.; Viaene, J. y Kruif, A. 2000. *Mycoplasma hyopneumoniae*: Bedit to lost of Vaccination. *Proccedings of American Association of Swine Practitioners*. Indianápolis. 327-333.
106. **Mare, C.**, y Switzer, w.1965. New species. *Mycoplasma hyopneumoniae*, a causative agent of virus pig pneumonia. *Vet Med* 60:841-846.
107. **Mateu de Antonio, E.**; Martín, M. y Casal, J. 1997. La respuesta inmunológica en el cerdo. *Rev. Anapora*. 7(63): 5-19.
108. **Mebus, CA.** y Underdahl, NR. 1977. Scanning electron microscopy of trachea and bronchi from gnotobiotic pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* 38:1249-1254.
109. **Messier, S.**; Ross, R.F. ; Paul, P.S. 1990. Humoral and cellular immune responses of pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumioniae*. *Am. J. Vet. Res.* 51:52-58.

110. **Messier, S.;** Ross, R.F. 1991. Interactions of *Mycoplasma hyopneumoniae* with porcine lymphocytes. *Am. J. Res.* 52:1497-1502.
111. **Millar, L.** 2000. A field study comparison: Aqueous vs. Oil adjuvant *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. Proceedings of American Association of Swine Practitioners. Indianápolis. 113-115.
112. **Mori, Y,** Hamaoka, T; Sato, S. 1987. Use of monoclonal antibody in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Isr. J. Med. Sci.*; 23:657-662
113. **Mori, Y;** Hamaoka, T; Sato, S; Takeuchi, S. 1988. Immunoblotting analysis of antibody response in swine experimentally inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Immunol. Immunopathol*; 19:239-250
114. **Morilla, A.** 1997. Manual para el control de las enfermedades infecciosas de los cerdos. Ed. INIFAP-SAGAR y PAIPEMSAC. México, D.F.: 58-73.
115. **Morrison, R. B.** 1984. PhD Thesis, University of Minnesota.
116. **Neyrolles, OI;** Chambaud, S; Ferris, M; Provost, M; Savak, T, Montaignen, L; Blanchard, A. 1999. Phase variations of *Mycoplasma penetrans* major surface lipoprotein increase antigenic diversity. *Infect Immun*; 67: 1569-1578.
117. **Noyes, E.;** Pijoán, C. y Fenney, D. 1988. Radiographic study of the evolution of the pneumonic process in slaughter pigs. Proceedings of American Association of Swine Practitioners. 277.
118. **Noyes, EP.;** Feneey DA.; Piojan, C. 1990. Comparison of the effect of pneumonia detected during lifetime with pneumonia detected at slaughter on growth in swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 197:1025-1029.

119. **Park, SC.**; Yibchok-Anun, S.; Cheng, H.; Young, TF.; Thacker, EL.; Minion, FC.; Ross, RF.; Hsu, WH. 2002. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases intracellular calcium release in porcine ciliated tracheal cells. *Infect Immun.*; 70(5): 2502-6.
120. **Piffer, I.** 1983. Pneumonia Enzoótica dos Suínos. Circular Técnico. Embraga. CNIPSA. 5:5-15.
121. **Piffer, I.**; Ross, F. 1984. Effect of age on susceptibility of pigs to *Mycoplasma hyopneumoniae* pneumonia. *Am J. Vet. Res.* 45:478-481.
122. **Piffer, I.**; Brito, J.R. 1991. Descrição de un modelo para avaliação e quantificação de lesões pulmonares de suínos e formulação de un índice para classificação dos rebanhos. Concordia. SC, EMBRAPA-CNPSA. 12p (EMBRAPA-CNPSA. Documento, 23)
123. **Pijoan, C.**; Torremorel, M. 1999. Interacciones y epidemiología en las enfermedades respiratorias del cerdo. Jornadas técnicas de actualización en Porcicultura-Serpor 99. pág 7-14.
124. **Pijoan, C.** 2002. Update on Mycoplasma Research at the SDEC. En: [http://academicserver.cvm.umn.edu/sdec/Update on Mycoplasma research at the SDEC.pdf](http://academicserver.cvm.umn.edu/sdec/Update%20on%20Mycoplasma%20research%20at%20the%20SDEC.pdf). Jueves, 01 de julio del 2004.
125. **Plonart, H.** y Bickhardt, K. 2001. Manual de enfermedades del cerdo. Acriba: España. Págs.: 141 – 147.
126. **Pommier, P.**; Keita, A.; Pagot, E.; Walters, JR.; Flochlay, A. 2000. Field efficacy of a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine in the control of enzootic pneumonia in swine. *Rev. Sci. Med.* 151, 835-840.
127. **Poveda, J.**; Ramírez, A.; De la Fe, C.; Assuncao, P. y Díaz-Bertrana, L. 2000. Micoplasmas. En: Manual de Microbiología Veterinaria. 423-430.



128. **Pullar, E.** 1948. Infectious pneumonia of pigs. I General description, differential diagnosis and epidemiology. Aust Vet J 24:320-330.
129. **Quinn, P.J.**, Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J. and Leonard, F.C. 2002. Mycoplasma. In: Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Blackwell Science Ltd. English. p.189-195.
130. **Rautiainen, E;** Virtala, AM; Wallgren, P; Saloniemi, H. 2000. Varying effects of infections with *Mycoplasma hyopneumoniae* on the weight gain recorded in three different Rautiainen, E. 2001. *Mycoplasma hyopneumoniae* – Aspects of epidemiology, protection and control. Faculty of Veterinary Medicine of the University of Helsinki. Finland. June 20<sup>th</sup>.
131. **Razin, S.** and Jacobs, E. 1992. Mycoplasma adhesion. J. Gen. Microbiol. 138:407–422.
132. **Rislakki, V.** 1953. Om deems i Finland före kommande smittosamma grishostans etiology. Infektion sförsök. Nord. Vet. Med. 5: 113.
133. **Roberts, ED;** Switzer, WP; L'Ecuyer, C. 1962. Influence of *Pasteurella multocida* and *Mycoplasma hyorhinis* (PPLO) on the histopathology of field cases of swine pneumonia. Cornell Vet. 52:306-327.
134. **Roberts, N.E.** and Almond, G.W. 2003. Infection of growing swine with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae* - Effects on growth, serum metabolites, and insulin-like growth factor-J. Can. Vet. J. 44, 31-37.
135. **Rosengarten, R.** y Wise, KS. 1991. The Vlp system of *Mycoplasma hyorhinis*: combinatorial expression of distinct size variant lipoproteins generating high-frequency surface antigenic variation. J. Bacteriol. 173: 4782– 4793.
136. **Ross, RF** and Whittlestone 1983 Comparison of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains by serological methods. Am J Vet Res 44:2087-2094

137. **Ross, R.F.** 1986. Mycoplasmal diseases. In: Disease of swine. 6th Ed. Ed Leman A. Et al. Iowa State University Press. Ames, Iowa. pp 469-475.
138. **Ross, R.F.** 1992. Mycoplasmal diseases. In: Disease of swine. 7th Ed. Ed Leman A. Et al. Iowa State University Press. Ames, Iowa. pp 538.
139. **Ross, R.F.** 1999. Mycoplasmal diseases. In: Disease of Swine. 8th ed. Barbara Straw, Sylvie D'Allaire, William L. Mengeling and David J. Taylor (Ed). Iowa State University Press. Ames, Iowa. USA p.495-501.
140. **Ross, R.F.** 2000. Enfermedades micoplasmáticas. En: Enfermedades del cerdo. 8<sup>va</sup> Edición. Vol. I. Capítulo 31. Ed. Straw B. Editorial Interamericana. Buenos Aires.
141. **Rottem, S.;** Naot, Y. 1998. Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. Trends in Microbiology. 6 (11): 436-440. November 1998.
142. **Rottem, S.** 2003. Interaction of Mycoplasmas With Host Cells. *Physiol. Rev.* 83: 417-432.
143. **Rubin, E.** y Farber, J. 1990. Patología. Edit. Medica Panamericana. 313-314.
144. **Ruiz, A.;** Pijoan C.; 2002. Efectos de la vacunación sobre la prevalencia de *Mycoplasma hyopneumoniae* Memorias I Congreso Latinoamericano de Suinocultura.
145. **Scheidt, A.;** Mayrose, V.B.; Hill, M.A. 1990. Relationship of growth performance to pneumonia and atrophic rhinitis detected in pigs at slaughter. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196:881-884.
146. **Schifferli, C.;** Sonez, C.; Gonzáles, H.; Demo, M.; Paz, M.; Finola, M.; Cacciavilani, A. y Mugnaini, M. 1990. Neumonía micoplásmica porcina:

patología y aislamiento de micoplasmas del tracto respiratorio del cerdo.  
Arch Med Vet 22:71-77.

147. **Siugzdaite, J.** y Garlaite, K. 2002. Effect of Vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in a Pig Herd from Birth to Slaughter. Acta Vet. Brno 71: 549-553.
148. **Sherm, B.;** Gerlarch, G.; Runge, M. 2002. Analysis of heat shock protein 60 encoding genes of mycoplasmas and investigation concerning their role in immunity and infection. *Vet. Microbiol.* 89: 141-150.
149. **Sorensen, V.,** Ahrens, P., Barfod, K., Feenstra, A.A., Feld, N.C., Friis, N.F., Bille-Hansen, V., Jensen, N.E. and Pedersen, M.W. 2002. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: Duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Vet. Microbiol.* 54, 23-34.
150. **Stevenson, G.W.** 1999. Common Mistakes in Interpretation of population serology. Animal diseases Diagnostic Laboratory, Purdue University, West Lafayette, IN. American Association of Swine Practitioners. p. 339-343.
151. **Sitjar, M.;** Noyes, E.P; Simon, X.; Pijoan, C. 1996. Relationships among seroconversion to *Mycoplasma hyopneumoniae*, lung lesions, and production parameters in pigs. *Swine Health Prod.* 4: 273-277.
152. **Stipkovits, L; Nicolet, J; Haldimann, A; Frey, J.** 1991. Use of antibodies against the p36 protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* for the identification of M. hyopneumoniae strains. *Mol. Cell. Probes* 5:451-457
153. **Stipkovits, L.** 1995. Neumonía por Micoplasma en el cerdo PIGS-Misset, Sep: 18-19.
154. **Strasser, M., J. Frey, G. Bestetti, M. Kobisch, and J. Nicolet.** 1991. Cloning and expression of a novel species-specific early immunogenic 36-kilodalton of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 59:1217-1222

155. **Suárez, P.; Casas, J.** 2001. Manejo del Síndrome Respiratorio Porcino. Seroperfiles y medicación estratégica. Citado Octubre 2004. [Online] Junio 2001. Disponible en [http://www.colvet.es/infovet/mar01/ciencias\\_v/articulo2.htm](http://www.colvet.es/infovet/mar01/ciencias_v/articulo2.htm)
156. **Surprenant, C.** 2001. *Mycoplasma hyopneumoniae*: serologic interpretation of herd profiles. Proceedings, American Association of Swine Practitioners 32<sup>nd</sup> annual: 477.
157. **Suter, M.; Kobisch, M.; Nicolet, J.** 1985. Stimulation of immunoglobulin containing cells and isotype-specific-pathogen-free pigs. *Infect. Immun.* 49:615-620.
158. **Tajima M.** 1984. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs immunosuppressed by thymectomy and treatment with antithymocyte serum. American Journal of Veterinary Research. 45: 1928 – 1932.
159. **Taylor, D.** 1986. Pig Diseases. The Burlington Press, Cambridge, 4<sup>ta</sup> ed, 112-121.
160. **Thacker, E.L.** 1997. Mycoplasma Vaccines: What we know, what we don't know. Proceedings of the Iowa State University Veterinary Medicine Seminar. pp.11-13.
161. **Thacker, B.J.;** Boettcher, T.; Anderson, T.; Thacker, E.; Young, T. 1998. The influence of passive immunity on serological responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination. Proceedings of 15<sup>th</sup> IPVS Congress Birmingham.
162. **Thacker, E.;** Halbur, P.; Ross, R.; Thanawongnuwech, R. y Thacker, B. 1999a. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus- induced pneumonia. Journal of Clinical Microbiology. 37 (3): 620-627.

163. **Thacker, E.;** Halbur, G. y Thacker, B. 1999b. Effect of vaccination on dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and PRRSV. Proceedings of American Association of Swine Practitioners. St. Louis. 375-377.
164. **Thacker, E. y Thacker, B.** 1999c. *Mycoplasma hyopneumoniae* and PRRS in the finisher. Proceedings of American Association of Swine Practitioners. St. Louis. 483-485.
165. **Thacker, B.; Thacker, E.;** Halbur, P.; Minion, E.; Young, T.; Erickson, B.; Thanawonguwech, T. 2000. The influence of maternally derived antibodies on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. In. Proc.16<sup>th</sup> Congress International Pig Veterinary Society, Melbourne, Australia. p. 454.
166. **Thacker, E.L.** 2001. Mycoplasma diagnosis and Immunity. Proceeding, American Association of Swine Veterinarians 32<sup>nd</sup> annual: 467-469.
167. **Thacker, E.** 2001a. Mycoplasma diagnosis and immunity. American Association of Swine Veterinarians. 32<sup>nd</sup> annual. 427-269.
168. **Thacker, B.; Thacker, E.** 2001. Influence of maternally-derived antibodies on the efficacy of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin. American Association of Swine Veterinarians. pp. 513-515.
169. **Thacker, E.L.** 2004. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Swine Health Prod.* 12(5): 252-254.
170. **Torres M.** 2003. Determinación serológica de la infección con *Mycoplasma hyopneumoniae* en una granja de cerdos de crianza intensiva. Tesis. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos. Lima - Perú.
171. **Trully, J. y Whitcomb, R.** 1979. The mycoplasma Vol II. Human and Animal Mycoplasmas. Academic Press. N.Y. 10-24.
172. **Truchan, L.; Jolie, R.; Runnels, P. y McGavin, D.** 2000. Eighteen week duration of Immunity in Pigs vaccinated at 3 or 8 weeks of Age with One

Dose of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin. Proceedings of American Association of Swine Practitioners. Indianapolis. 125.

173. **Tuovinen, VK; Gröhn, YT; Straw, BE.** 1994. Health classification of multisource feeder pigs - a field trial. Prev. Vet. Med. 20; 11-22.
174. **Underdahl, NR; Kennedy, GA; Ramos, AS.** 1980. Duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in gnotobiotic pigs. Can. Vet. J. 21:258-261.
175. **Valdivia, L.; Calle S.** 1999. Respuesta a la vacunación contra neumonía enzoótica porcina en términos de producción en explotación intensiva de cerdos. Rev. Inv. Vet. Perú. 10 (2):71-73.
176. **Verdin, E.; Kobish, M.; Bove, J.; Garnier, M. y Saillard, C.** 2000. Use of an internal control in a nested PCR assay for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection and quantification intracheobromchiolar washings from pigs. Molecular and Cellular Probes. 14(6); 365-372.
177. **Wallgren, P.; Artursson, K., Fossum, C.; Alm, G.** 1993. Incidence of infections in pigs bred for slaughter revealed by elevated serum levels of interferon and development of antibody to *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Vet. Med. B. 40:1-12.
178. **Wallgren, P.; Schwan, O.; Mattson, S. y Bolske, G.** 1996. Comparison of the sensitivity of two ELISA systems for detection of antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in naturally infected pigs. In Proc of Inter Pig Vet Soc Congress. 217.
179. **Wallgren, P.; Bolske, G.; Gustafsson, S. y Fossum, C.** 1998 Humoral immune response to *Mycoplasma hyopneumoniae* in sows and offsprings followings an outbreak of mycoplasmosis. Vet. Microb. 1998. 60: 193-205.

180. **Wesslen, T. y Lannek, N.** 1954. The isolation and cultivation in tissue cultural of a cytopathogenic agent from pigs with enzootic pneumonia (so-called virus pneumonia). Nord. Vet. Med. 6:481.
181. **Wise, KS; Kim, MF; Theiss, PM; Lo, SC.** 1993. A family of strain-variant surface lipoproteins of *Mycoplasma fermentans*. Infect. Immun. 61: 3327–3333.
182. **Whittlestone, P.** 1973. Enzootic pneumonia of pigs (EPP) adv Vet Sci comp Med. 17:1 – 5.
183. **Wolfgang, K; Willett, H; Bernard, A; Wilfert, C.** 1997. Microbiología. 20<sup>a</sup> ed. Médica Panamericana – Buenos Aires, Argentina. Págs: 987-996.
184. **Yeske, P.** 2001. Experiences with Mycoplasma vaccination: what to do if vaccination doesn't live up expectations. Proceedings of Allen D. Leman. Conference University of Minnesota. USA. pp 108-110.
185. **Yogev, D.; Menaker, K.;** Strutzberg, K.; Levisohn, S.; Kirchhoff, H.; Hinz, K.; Rosengarten, R. 1994. A surface epitope undergoing high-frequency phase variation is shared by *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma bovis*. Infect. Immun. 62:4962-4968.
186. **Zielinski, GC; Young, TF; Ross, RF.** 1990. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to cell monolayers. Am. J. Vet. Res. 51:339-343.
187. **Zielinski G.,** Ross R.F. 1993. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. Am. J. Vet. Res. 54:1262-1269.
188. **Zhang, Q; Xu, W; Li, J; Ding, Q; Wang, G.** 1990. Attenuated pathogenicity of the lapinized strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs. J. Chin. Electron Microsc. Soc. 9(1):5-9.

189. **Zhang, Q.;** Young T.F.; Ross, R.F. 1994a. Glycolipid receptors for attachment of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine respiratory ciliated cells. *Infect. Immun.* 62 (10): 4367-4373.
190. **Zhang, Q.;** Young T.F.; Ross, R.F. 1995. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesion. *Infect. Immun.* 63: 1013-1019.

## IX.- ANEXOS

Anexo 1.- Distribución de los títulos de anticuerpos contra <i>M. hyopneumoniae</i> en cerdos procedentes de madres sin antecedentes de vacunación.						
Día de Muestreo	Estrategia de vacunación	Numero de animales	Título de anticuerpos	Desviación estándar	Valores extremos	
					Mínimo	Máximo
21	Control	30	2.60 <sup>a</sup>	0.53	1.51	3.88
	Vacuna (35-56d)	30	2.66 <sup>a</sup>	0.46	1.07	3.14
	Vacuna (42-56d)	30	2.53 <sup>a</sup>	0.49	1.64	3.33
	Vacuna Oleosa	30	2.48 <sup>a</sup>	0.51	1.47	3.38
46	Control	30	2.04 <sup>a</sup>	0.44	1.16	2.77
	Vacuna (35-56d)	30	2.49 <sup>b</sup>	0.44	0.83	2.91
	Vacuna (42-56d)	30	1.91 <sup>a</sup>	0.56	0.12	2.80
	Vacuna Oleosa	30	2.10 <sup>a</sup>	0.44	1.18	2.97
70	Control	30	1.72 <sup>a</sup>	0.62	0.61	3.56
	Vacuna (35-56d)	30	3.34 <sup>c</sup>	0.28	2.51	3.72
	Vacuna (42-56d)	30	3.15 <sup>c</sup>	0.36	1.56	3.50
	Vacuna Oleosa	30	2.64 <sup>b</sup>	0.56	1.18	3.52
84	Control	30	2.19 <sup>a</sup>	0.75	0.61	3.81
	Vacuna (35-56d)	30	3.26 <sup>c</sup>	0.26	2.30	3.61
	Vacuna (42-56d)	30	3.15 <sup>c</sup>	0.29	2.49	3.63
	Vacuna Oleosa	30	2.75 <sup>b</sup>	0.62	1.46	3.63
112	Control	30	2.46 <sup>a</sup>	0.73	0.81	3.61
	Vacuna (35-56d)	30	3.13 <sup>b</sup>	0.31	2.18	3.66
	Vacuna (42-56d)	30	3.26 <sup>b</sup>	0.30	2.21	3.66



	Vacuna Oleosa	29	3.10 <sup>b</sup>	0.47	2.23	3.73
145	Control	30	3.20 <sup>ab</sup>	0.47	1.50	3.74
	Vacuna (35-56d)	30	3.43 <sup>b</sup>	0.23	2.55	3.69
	Vacuna (42-56d)	30	3.06 <sup>a</sup>	0.34	2.00	3.64
	Vacuna Oleosa	29	3.28 <sup>ab</sup>	0.30	2.62	3.82

Apéndice 2.- Distribución de los títulos de anticuerpos contra <i>M. hyopneumoniae</i> en cerdos procedentes de madres con antecedentes de vacunación.						
Día de Muestreo	Estrategia de vacunación	Numero de animales	Título de anticuerpos	Día de Muestreo	Valores extremos	
					Mínimo	Máximo
21	Control	30	3.50 <sup>b</sup>	0.31	2.57	3.84
	Vacuna (35-56d)	30	3.72 <sup>b</sup>	0.15	3.40	3.99
	Vacuna (42-56d)	30	3.38 <sup>b</sup>	0.40	2.33	3.88
	Vacuna Oleosa	30	2.76 <sup>a</sup>	0.85	0.00	3.57
46	Control	30	3.09 <sup>a</sup>	0.69	0.00	3.70
	Vacuna (35-56d)	30	3.45 <sup>a</sup>	0.19	3.11	3.82
	Vacuna (42-56d)	29	3.06 <sup>a</sup>	0.32	1.90	3.45
	Vacuna Oleosa	30	4.86 <sup>a</sup>	13.27	0.98	75.00
70	Control	29	2.22 <sup>a</sup>	0.98	0.00	3.38
	Vacuna (35-56d)	30	3.20 <sup>c</sup>	0.20	2.59	3.41
	Vacuna (42-56d)	29	2.89 <sup>bc</sup>	0.60	0.00	3.29
	Vacuna Oleosa	30	2.70 <sup>b</sup>	0.50	0.98	3.53
84	Control	29	1.92 <sup>a</sup>	0.85	0.00	2.90
	Vacuna (35-56d)	30	3.02 <sup>b</sup>	0.30	2.21	3.64
	Vacuna (42-56d)	29	2.77 <sup>b</sup>	0.30	2.20	3.22
	Vacuna Oleosa	30	2.80 <sup>b</sup>	0.53	0.93	3.60
112	Control	29	2.43 <sup>a</sup>	1.09	0.00	3.60
	Vacuna (35-56d)	30	3.31 <sup>c</sup>	0.34	2.22	3.68
	Vacuna (42-56d)	29	2.59 <sup>ab</sup>	0.61	0.00	3.13
	Vacuna Oleosa	30	2.89 <sup>bc</sup>	0.39	2.24	3.70
145	Control	29	2.82 <sup>a</sup>	0.38	1.75	3.40
	Vacuna (35-56d)	30	3.46 <sup>c</sup>	0.22	2.84	3.78
	Vacuna (42-56d)	29	3.14 <sup>ab</sup>	0.37	1.93	3.62
	Vacuna Oleosa	29	2.77 <sup>ab</sup>	0.74	1.10	3.75

Anexo No. 3 Medicion de Anticuerpos en diferentes tratamientos								
Dia de Medición	Lechones de Madres No Vacunadas				Lechones de Madres Vacunadas			
	(s/vac)	(35 y 56 días)	(42 y 56 días)	(42 días)	(s/vac)	(35 y 56 días)	(42 y 56 días)	(42 días)
21	2.6	2.66	2.54	2.48	3.5	3.72	3.84	2.76
46	2.04	2.49	1.91	2.11	3.09	3.45	3.06	4.86
70	1.72	3.34	3.15	2.64	2.22	3.2	2.89	2.7
84	2.19	3.26	3.15	2.75	1.92	3.02	2.77	2.81
112	2.46	3.13	3.27	3.1	2.43	3.31	2.59	2.89
145	3.21	3.43	3.06	3.28	2.82	3.46	3.14	2.77

Anexo No. 4 Medición de Anticuerpos en diferentes tratamientos							
		21 d	46 d	70 d	84 d	112 d	145 d
No Vac.	NV control	2.6	2.04	1.72	2.19	2.46	3.21
	NV R35	2.66	2.49	3.34	3.26	3.13	3.43
	NV 42	2.54	1.91	3.15	3.15	3.27	3.06
	NV R1	2.48	2.11	2.64	2.75	3.1	3.28
Vac.	V control	3.5	3.09	2.22	1.92	2.43	2.82
	V R35	3.72	3.45	3.2	3.02	3.31	3.46
	V R42	3.84	3.06	2.89	2.77	2.59	3.14
	V R1	2.76	4.86	2.7	2.81	2.89	2.77

Anexo No.5 MEDICIÓN DE INDICE DE PULMONES													
Grupo de porcinos provenientes de madres no vacunadas													
NV ctrl				NV R35				NV R 42				NV R1	
cat	No			cat	No			cat	No			cat	No
0	11	0		0	18	0		0	15	0		0	20
1	8	8		1	12	12		1	12	12		1	8
2	8	16		2		0		2	3	6		2	1
3	1	3		3		0		3		0		3	
4	0	0		4		0		4		0		4	
5	1	5		5		0		5		0		5	
6	1	6		6		0		6		0		6	
	30	38			30	12			30	18			29
	Índice	1.27			Índice	0.40			Índice	0.60			Índice

Anexo No.6 MEDICIÓN DE INDICE DE PULMONES GRUPO DE PORCINOS PROVENIENTES DE MADRES VACUNADAS													
V ctrl				V R35				V R 42				V R1	
cat	No			cat	No			cat	No			cat	No
0	13	0		0	20	0		0	19	0		0	22
1	14	14		1	8	8		1	10	10		1	4
2	2	4		2	2	4		2	1	2		2	1
3	0	0		3		0		3		0		3	0
4	1	4		4		0		4		0		4	1
5	0	0		5		0		5		0		5	0
6	0	0		6		0		6		0		6	0
	30	22			30	12			30	12			28
	Índice	0.73			Índice	0.40			Índice	0.40			Índice

Anexo 7.- COMPARACIÓN DE INDICE DE PULMONES VS GANANCIA DE PESOS EN GRUPO DE PORCINOS PROVENIENTES DE MADRES CON Y SIN VACUNACIÓN								
	NV ctrl	NV R35	NV R 42	NV R1	V ctrl	V R35	V R 42	V R1
Peso	85.8	86.7	83.2	87.3	80.7	82.2	87.4	82.9
Índice	1.27	0.40	0.60	0.34	0.73	0.40	0.40	0.36

## RELACIÓN DE FOTOS

Foto No 1.- Lesiones macroscópicas de pulmones con Índice paraneumonico.



Foto No 2.- Bronconeumonías o pleuroneumonías graves irreversibles, localizadas en bordes de los lóbulos apicales y cardíaco del pulmón con tonalidad grisácea que pasa a rosa intenso y rojo oscuro.

